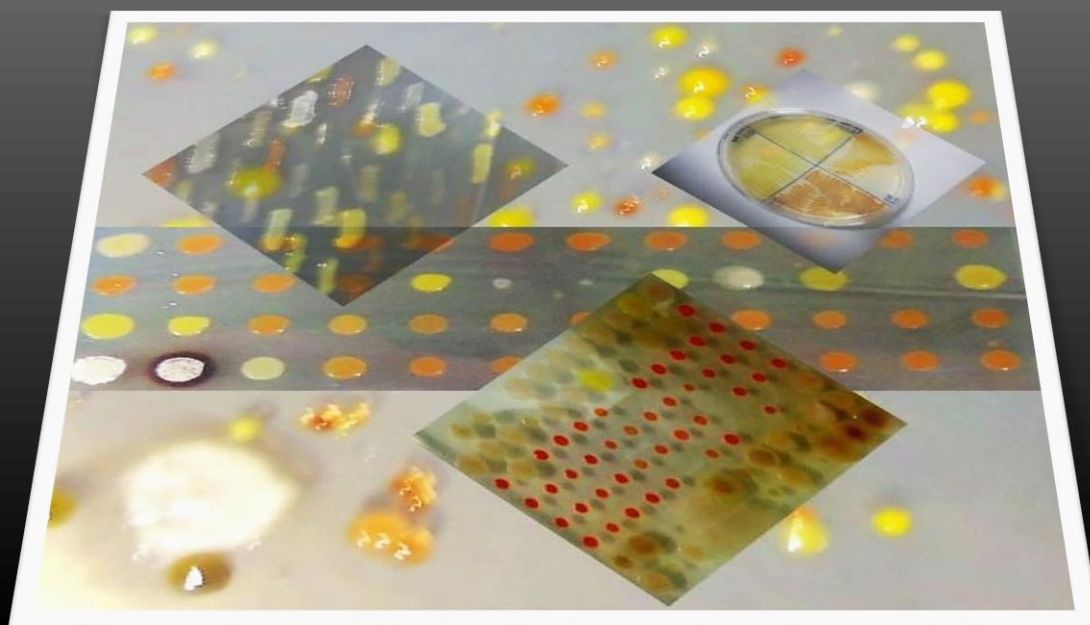


**Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular**

**ABUNDANCIA, DIVERSIDAD Y PERFILES DE  
MULTIRRESISTENCIA DE BACTERIAS CULTIVABLES  
RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS EN LA RÍA DE HUELVA Y  
LA CHORRERA DE DESPEÑALAGUA (GUADALAJARA)**



**Tesis Doctoral**

**Benedito Eduardo Correia**

**Madrid, 2015**

**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Biología Molecular**



**ABUNDANCIA, DIVERSIDAD Y PERFILES DE  
MULTIRRESISTENCIA DE BACTERIAS CULTIVABLES  
RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS EN LA RÍA DE HUELVA Y  
LA CHORRERA DE DESPEÑALAGUA (GUADALAJARA)**

**Tesis Doctoral**

**Benedito Eduardo Correia**

**2015**



**ABUNDANCIA, DIVERSIDAD Y PERFILES DE  
MULTIRRESISTENCIA DE BACTERIAS CULTIVABLES  
RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS EN LA RÍA DE HUELVA Y  
LA CHORRERA DE DESPEÑALAGUA (GUADALAJARA)**

Memoria presentada por Benedito Eduardo Correia para optar al grado de  
Doctor en Microbiología por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis Doctoral  
Dr. José Pascual Abad Lorenzo

***A mi esposa Hanna Sophie Koller***

*Por ser el impulso durante todo este tiempo, que con su apoyo constante, paciencia y amor incondicional, ha sido amiga y compañera inseparable, fuente de calma y consejo en todo el momento. Hoy hemos alcanzado un triunfo más porque los dos somos uno y mis logros son tuyos.*

***A mis padres Eduardo Correia y Mariama Mendes***

*Por ser el cimiento primordial en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su amor y apoyo incondicional perfectamente mantenido a través del tiempo.*



## **Agradecimientos**

*En este trabajo de tesis realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid es un esfuerzo en el cual, participaron muchas personas a las que me gustaría agradecer en este apartado por sus amistades, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos difíciles. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos o en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí vida y por todo lo que me han brindado.*

*Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID) por brindarme la oportunidad de hacer realidad mi sueño de ser doctor a través del programa internacional de Becas de Doctorado y la Universidad Autónoma de Madrid por proporcionar todo el soporte necesario y contribuir en mi formación profesional.*

*Agradecimiento especial a Dr. José Pascual Abad Lorenzo y por permitirme realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar ha sido un aporte inestimable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también por su amistad. A Dr. Irma Marín Palma por su apoyo constante durante todo el proceso de desarrollo de esta tesis. Les agradezco también haberme facilitado siempre los medios de las que dispongan para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.*

*Asimismo, agradezco a todos mis profesores, compañeros y amigos del Departamento, Héctor Morales Filloy, Khoula Ferraga, Ana Morato, Ana Morro, Jelena Lazarevic, Carlotta Vizioli, Nicolás Raho, José Luis Sanz Martínez, Mustafa Malki, Kary Haro, Aldo González, Concha Abrusci, Patricia Rojas, Tania Leandro, Mirna Martínez Abreu, Emiliano Díaz, Nuria López y Mitsue Nakazawa, con quienes he compartido laboratorio, incontables horas de trabajo, ilusiones y muy buenos ratos lo cual no tiene precio. Por todo el tiempo que me han dado, por las conversaciones científicas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y la amistad. Gracias por aguantarme y*

*escucharme, por los buenos y malos momentos. Nos hemos dado ánimos por el camino, y eso siempre aporta optimismo.*

*A Juan José Cruz por asesorarme con las estadísticas del trabajo y dudas durante la elaboración de la tesis.*

*A mis hermanos, a mis sobrinos y a toda mi familia en Guinea-Bissau por su amor, apoyo incondicional y por ser parte importante de mi vida, representando siempre la unidad familiar.*

*A mis suegros Chris y Ralf y a mi cuñada Pauline por el apoyo moral y por saber que siempre puedo contar con ellos.*

*A mis amigos Luis Fernandes, Tiago, Arlindo, Gliselle Nieves y Silvia Gonzáles por vuestra amistad y por saber que siempre puedo contar con vosotros.*

*A todos los que no he mencionado y que de una forma directa o indirecta me han brindado su apoyo, muchas gracias.*



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>i</b>
<b>Listado de tablas .....</b>	<b>v</b>
<b>Listado de figuras .....</b>	<b>vii</b>
<b>Summary .....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Los antibióticos .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Mecanismo de actuación de los antibióticos .....	4
1.1.1.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular .....	6
1.1.1.2. Alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática .....	7
1.1.1.3. Inhibición de la síntesis de proteínas .....	8
1.1.1.4. Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos .....	9
1.1.2. Antibióticos betalactámicos .....	10
<b>1.2. Función de los antibióticos en la naturaleza .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Resistencia a los antibióticos .....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Mecanismos moleculares de la resistencia a los antibióticos .....	14
1.3.1.1. Resistencia intrínseca .....	14
1.3.1.2. Resistencia adquirida .....	15
1.3.1.3. Resistencia a los antibióticos betalactámicos .....	15
1.3.2. Diseminación de la resistencia .....	16
1.3.3. Función de la resistencia a antibióticos en la naturaleza .....	20
<b>1.4. Antecedentes de nuestro estudio .....</b>	<b>21</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>27</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Reactivos utilizados y casa comercial de procedencia .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Descripción de las zonas de estudio .....</b>	<b>32</b>
3.2.1. Situación geográfica y características de la ría de Huelva .....	32
3.2.1.1. Zonas de muestreo .....	33
3.2.2. Situación geográfica y características de la Chorrera de Despeñalagua .....	34
3.2.2.1. Zonas de muestreo .....	35
<b>3.3. Determinación de la abundancia de bacterias totales y cultivables resistentes a diferentes antibióticos .....</b>	<b>36</b>
3.3.1. Bacterias totales .....	36
3.3.2. Bacterias cultivables y resistentes a antibióticos .....	37
<b>3.4. Aislamiento y conservación de bacterias resistentes a ampicilina .....</b>	<b>37</b>

<b>3.5. Determinación de la multirresistencia de los aislados y cálculo del índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR)</b>	<b>38</b>
3.5.1. Determinación de la multirresistencia	38
3.5.2. Cálculo de los índices de resistencia múltiple a antibióticos (MAR)	40
<b>3.6. Asignación filogenética</b>	<b>40</b>
3.6.1. Extracción de ADN bacteriano	41
3.6.2. Amplificación por PCR de las secuencias de los genes de ARNr 16S y <i>rpoD</i>	41
3.6.3. Secuenciación y análisis de las secuencias	42
<b>3.7. Análisis estadísticos</b>	<b>44</b>
3.7.1. Resultados de la multirresistencia	44
3.7.2. Coexistencia de las resistencias a dos antibióticos	45
3.7.3. Cálculo de los índices de biodiversidad	45
3.7.3.1. Índice de Margalef	45
3.7.3.2. Índice de Simpson	46
3.7.3.3. Índice de Shannon-Wiener	46
<b>4. Resultados</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Características de las muestras de la ría de Huelva</b>	<b>51</b>
4.1.1. Parámetros fisicoquímicos	51
4.1.2. Abundancia de bacterias totales y cultivables	51
4.1.3. Abundancia de bacterias resistentes a los antibióticos	53
4.1.4. Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a ampicilina	55
4.1.4.1. Aislamiento de bacterias	55
4.1.4.2. Distribución de los aislados según sus índices MAR y perfiles de multirresistencia	55
4.1.4.3. Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según la zona de muestreo y los medios de cultivo	60
4.1.4.4. Asignación filogenética de los aislados seleccionados	62
4.1.4.4.1. A niveles de clase y género	62
4.1.4.4.2. A nivel de especie	66
4.1.4.4.2.1. Índices de biodiversidad a nivel de especies	72
4.1.4.5. Prevalencia de la resistencia a los antibióticos según los géneros a los que pertenecen	72
4.1.4.6. Análisis de la asociación de las resistencias a dos antibióticos	77
<b>4.2. Caracterización de las muestras de la Chorrera de Despeñalagua</b>	<b>80</b>
4.2.1. Parámetros fisicoquímicos	80
4.2.2. Abundancia de bacterias totales y cultivables	80

4.2.3.	Abundancia de bacterias resistentes a los antibióticos .....	81
4.2.4.	Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a ampicilina .....	82
4.2.4.1.	Aislamiento de las bacterias .....	82
4.2.4.2.	Distribución de los aislados según sus índices MAR y perfiles de multirresistencia .....	83
4.2.4.3.	Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según la zona de muestreo y los medios de cultivo .....	85
4.2.4.4.	Asignación filogenética de los aislados seleccionados .....	86
4.2.4.4.1.	A niveles de clase y género .....	87
4.2.4.4.2.	A nivel de especie .....	89
4.2.4.4.2.1.	Índices de biodiversidad a nivel de especie .....	91
4.2.4.5.	Prevalencia de los aislados resistentes a los antibióticos según los géneros a los que pertenecen .....	92
4.2.4.6.	Análisis de la asociación de las resistencias a dos antibióticos .....	95
<b>4.3.</b>	<b>Estudio de la resistencia a ertapenem de las bacterias aisladas .....</b>	<b>97</b>
4.3.1.	Aislados procedentes de la ría de Huelva .....	97
4.3.1.1.	Prevalencia de los aislados resistentes a distintas concentraciones del antibiótico .....	97
4.3.1.2.	Distribución de los aislados <i>Ep</i> según su procedencia, medios de aislamiento y géneros a los que pertenecen .....	99
4.3.1.3.	CMI de Ertapenem y su distribución según la procedencia. medio de aislamiento y género de los aislados .....	102
4.3.2.	Aislados procedentes de la Chorrera de Despeñalagua .....	106
4.3.2.1.	Prevalencia de los aislados resistentes a distintas concentraciones del antibiótico .....	106
4.3.2.2.	Distribución de los aislados <i>Ep</i> según su procedencia, medios de aislamiento y géneros a los que pertenecen .....	108
4.3.2.3.	CMI de <i>Ep</i> y su distribución según la procedencia, medio de aislamiento y género de los aislados .....	110
<b>5.</b>	<b>Discusiones .....</b>	<b>117</b>
<b>5.1.</b>	<b>Características y parámetros fisicoquímicos de las zonas de estudio y de las muestras analizadas .....</b>	<b>120</b>
5.1.1.	Ría de Huelva .....	120
5.1.2.	Chorrera de Despeñalagua .....	121
<b>5.2.</b>	<b>Abundancia de bacterias totales, cultivables y resistentes a antibióticos .....</b>	<b>122</b>
5.2.1.	Ría de Huelva .....	122
5.2.2.	Chorrera de Despeñalagua .....	127

<b>5.3. Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a ampicilina .....</b>	<b>129</b>
5.3.1. Ría de Huelva .....	129
5.3.1.1. Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según las zonas de muestreo y los medios de cultivo .....	131
5.3.1.2. Biodiversidad de los aislados resistentes a ampicilina de la ría de Huelva .....	133
5.3.1.3. Distribución de la resistencia a los antibióticos entre los aislados asignados filogenéticamente .....	136
5.3.1.4. Asociación de las resistencias a dos antibióticos según los géneros ....	139
5.3.2. Chorrera de Despeñalagua .....	140
5.3.2.1. Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según las zonas de muestreo y los medios de cultivo .....	143
5.3.2.2. Biodiversidad de los aislados resistentes a ampicilina de la Chorrera de Despeñalagua .....	144
5.3.2.3. Distribución de la resistencia a los antibióticos entre los aislados asignados filogenéticamente .....	148
5.3.2.4. Asociación de las resistencias a los antibióticos según los géneros ....	152
<b>5.4. Prevalencia de los aislados resistentes a ertapenem y determinación de sus CMIs .....</b>	<b>154</b>
5.4.1. Ría de Huelva .....	154
5.4.2. Chorrera de Despeñalagua .....	162
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>169</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>175</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>205</b>

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\%_1$	Tanto por uno
%	Tanto por ciento
‰	Tanto por mil
% v/v	Porcentaje volumen-volumen
$\chi^2$	Chi-cuadrado de Pearson
$\phi 29$	Fago $\phi 29$
K	Índice de Kappa
$\lambda$	Índice de Simpson
$\mu\text{g/mL}$	Microgramo/mililitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Aero.</b>	<i>Aeromonas</i>
<b>AIQB</b>	Asociación De Industrias Químicas, Básicas y Energéticas de Huelva
<b>Alter.</b>	<i>Altererythrobacter</i>
<b>Ap</b>	Ampicilina
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosómico
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>At.</b>	Átomos
<b>Baci.</b>	<i>Bacillus</i>
<b>BLASTn</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BLEEs</b>	Betalactamasas de espectro extendido
<b>Brev.</b>	<i>Brevundimonas</i>
<b>BSAC</b>	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
<b>BVNC</b>	Bacterias viables no cultivables
<b>c/u</b>	Cada uno
<b>CBMSO</b>	Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
<b>Cc</b>	Cloranfenicol
<b>cél/mL</b>	Células/mililitro
<b>Ch</b>	Cicloheximida
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CMI<sub>90</sub></b>	Concentración mínima que produce 90% de inhibición
<b>Cz</b>	Ceftazidima
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
<b>D<sub>Mg</sub></b>	Índice de Margalef
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleósidos trifosfato
<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Aguas Residuales



## *Simbolos y abreviaturas*

<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EE.UU.</b>	Estados unidos de América
<b><i>Em</i></b>	Eritromicina
<b><i>Ep</i></b>	Ertapenem
<b><i>Eryt.</i></b>	<i>Erythrobacter</i>
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>G1 y G2</b>	Muestras procedentes de Guadalajara
<b>Gen.</b>	Generación
<b>GT</b>	Conjunto de todos los aislados de la Chorrera de Despeñalagua
<b>GTA</b>	Agentes de transferencia génica
<b>H'</b>	Índice de Shannon-Wiener
<b>H1L</b>	Muestra procedente de la Zona H1, fase líquida
<b>H1S</b>	Muestra procedente de la Zona H1, sedimento
<b>H2L</b>	Muestra procedente de la Zona H2, fase líquida
<b>H2S</b>	Muestra procedente de la zona H2, sedimento
<b>HGT</b>	Transferencia horizontal de genes
<b>HT</b>	Conjunto de todos los aislados de la ría de Huelva
<b>ICE</b>	Elementos conjugativos integrativos
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo
<b>IMP</b>	Imipenemase
<b>IS</b>	Secuencias de inserción
<b><i>Km</i></b>	Kanamicina
<b>Km<sup>2</sup></b>	Kilómetros cuadrado
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<b><i>Lutib.</i></b>	<i>Lutibacterium</i>
<b>M</b>	Medio marino
<b>MAR</b>	Índice de resistencia múltiple a antibióticos
<b><i>Mes.</i></b>	<i>Mesonía</i>
<b>MENSURA</b>	Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos
<b><i>Meth.</i></b>	<i>Methylobacterium</i>
<b>mg/mL</b>	Miligramo/mililitro
<b><i>Micr.</i></b>	<i>Microbacterium</i>
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mS/cm</b>	Milisiemens/centímetro
<b>mV</b>	Milivoltius
<b>N</b>	Medio nutritivo
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards

<b>NDM-1</b>	New Delhi Metallo-beta-lactamase-1
<b>Nx</b>	Ácido Nalidixico
<b>Ochr.</b>	<i>Ochrobactrum</i>
<b>OTUs</b>	Unidades Taxonómicas Operacionales
<b>OXA-48</b>	Oxacillinase-48
<b>Paen.</b>	<i>Paenibacillus</i>
<b>PBPs</b>	Penicillin Binding Proteins, proteínas de unión a penicilina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>Pdalt.</b>	<i>Pseudoalteromonas</i>
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>Phyl.</b>	<i>Phyllobacterium</i>
<b>Pont.</b>	<i>Ponticaulis</i>
<b>Psdo.</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Rahn.</b>	<i>Rahnella</i>
<b>Res.</b>	Resistente
<b>Resp. SOS</b>	Respuesta SOS
<b>Rp</b>	Rifampicina
<b>rpoD</b>	Gen que codifica para el factor $\sigma 70$ de la ARN polimerasa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>Serr.</b>	<i>Serratia</i>
<b>SFM</b>	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>SIdI</b>	Servicio Interdepartamental de Investigación
<b>Sm</b>	Estreptomicina
<b>sp.</b>	Especie
<b>Sphi.</b>	<i>Sphingopyxis</i>
<b>SPSS</b>	Statistical Package for Social Sciences
<b>TAE</b>	Disolución tampón formado por Tris, acetato y EDTA
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>Tm</b>	Trimetoprima
<b>TXRF</b>	Fluorescencia de Rayos X por reflexión Total
<b>U</b>	Unidades
<b>UDP-NAG</b>	Uridindifosfato-N-acetilglucosamina
<b>UDP-NAM</b>	Uridindifosfato-N-acetilmurámico
<b>ufc/mL</b>	Unidades formadoras de colonia/mililitro
<b>UPGMA</b>	Agrupación de pares no ponderados con medias aritméticas
<b>VIM</b>	Veronica Integron Metallo-beta-lactamases
<b>Vm</b>	Vancomicina

## LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.** Principales grupos de Antibióticos y sus representantes.
- Tabla 2.** Propiedades de los elementos genéticos implicados en HGT y en reclutamiento de genes.
- Tabla 3.** Reactivos utilizados y casas comercial de procedencia.
- Tabla 4.** Antibióticos empleados y concentraciones de los mismos utilizadas en los experimentos realizados.
- Tabla 5.** Cebadores usados en las PCRs y condiciones de éstas.
- Tabla 6.** Escala de valoración del índice de Kappa.
- Tabla 7.** Análisis elemental semicuantitativo de las muestras H1L y H2L.
- Tabla 8.** Análisis elemental cuantitativo de las muestras H1S y H2S.
- Tabla 9.** Valores estadísticos de la distribución de los índices MAR de los aislados según su procedencia.
- Tabla 10.** Número de perfiles de multirresistencia detectados en cada muestra y medio.
- Tabla 11.** Porcentajes de aislados resistentes a los antibióticos según las muestras.
- Tabla 12.** Porcentajes de aislados resistentes a los antibióticos según los medios de aislamiento.
- Tabla 13.** Distribución de los aislados según los géneros detectados en cada clase.
- Tabla 14.** Especies filogenéticamente más próximas a los aislados en base a las secuencias de sus ARNr 16S y su distribución según muestras y medios de aislamiento.
- Tabla 15.** Índices de biodiversidad a nivel de especie de los grupos de aislados agrupados según las zonas de muestreo y los medios de aislamiento.
- Tabla 16.** Matriz de concordancia entre la resistencia simultánea a dos antibióticos.
- Tabla 17.** Análisis elemental semicuantitativo de las muestras G1 y G2.
- Tabla 18.** Valores estadísticos de la distribución de los índices MAR de los aislados según su procedencia.
- Tabla 19.** Porcentajes de aislados resistentes a los distintos antibióticos según las muestras.
- Tabla 20.** Porcentajes de aislados resistentes a los antibióticos según los medios de cultivo.
- Tabla 21.** Distribución de los aislados según los géneros detectados en cada clase.
- Tabla 22.** Especies filogenéticamente más próximas a los aislados en base a la secuencia de sus ARNr 16S y su distribución según muestras y medios de aislamiento.

- Tabla 23.** Especies filogenéticamente más próximas a los aislados en base a la secuencia del gen *rpoD* y su distribución según muestras y medios de aislamiento.
- Tabla 24.** Índices de biodiversidad a nivel de especie de los aislados según las zonas de muestreo y los medios de cultivo.
- Tabla 25.** Matriz de concordancia entre la resistencia simultánea a dos antibióticos.
- Tabla 26.** Porcentajes de aislados resistentes a distintas concentraciones de ertapenem según las muestras de las que proceden.
- Tabla 27.** Porcentajes de aislados procedentes de la ría de Huelva resistentes a 2 µg/mL de ertapenem.
- Tabla 28.** Abundancia relativa de los aislados dentro de cada género con los valores de CMI indicados.
- Tabla 29.** Porcentajes de aislados procedentes de la Chorrera de Despeñalagua resistentes a 2 µg/mL de ertapenem.
- Tabla 30.** Abundancia relativa de los aislados dentro de cada género con los valores de CMI indicados.
- Tabla 31.** Posible patogenicidad de las especies encontradas en la ría de Huelva, según la literatura.
- Tabla 32.** Posible patogenicidad de las especies encontradas en la Chorrera de Despeñalagua, según la literatura.
- Tabla 33.** Comparación de las resistencias intrínsecas de género u orden encontradas en la ría de Huelva, en la Chorrera de Despeñalagua y en la bibliografía.

## **LISTADO DE FIGURAS**

- Figura 1.** Dianas de los antibióticos y mecanismos de resistencia.
- Figura 2.** Estructuras químicas de los principales tipos de antibióticos betalactámico e inhibidores de betalactamasas.
- Figura 3.** El resistoma antibiótico.
- Figura 4.** Factores implicados en la aparición y diseminación de las resistencias a antibióticos.
- Figura 5.** Mecanismos generales mediante los cuales puede ocurrir la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos.
- Figura 6.** Mapa de la ría de Huelva y el polígono industrial.
- Figura 7.** Zonas de muestreo en la Chorrera de Despeñalagua.
- Figura 8.** Pieza metálica de 96 pinchos utilizada en la determinación de la multirresistencia.
- Figura 9.** Abundancia relativa de bacterias cultivables resistentes a distintos antibióticos.
- Figura 10.** Porcentajes de aislados según sus índices MAR.
- Figura 11.** Distribución por clase de las bacterias identificadas.
- Figura 12.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos en los géneros indicados.
- Figura 13.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos indicado según el género al que pertenecen.
- Figura 14.** Abundancia relativa de bacterias cultivables resistentes a antibióticos.
- Figura 15.** Porcentajes de aislados según sus índices MAR.
- Figura 16.** Distribución por clase de las bacterias identificadas.
- Figura 17.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos en los géneros indicados.
- Figura 18.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos indicados según el género al que pertenecen.
- Figura 19.** Porcentajes de aislados resistentes a distintas concentraciones de ertapenem.
- Figura 20.** Porcentaje de bacterias resistentes a diferentes concentraciones de ertapenem según el medio de cultivo.
- Figura 21.** Porcentaje de aislados resistentes a ertapenem agrupados por géneros.
- Figura 22.** Porcentajes de los aislados identificados resistentes a ertapenem agrupados según las zonas de muestreo y los medios de cultivo.
- Figura 23.** Porcentajes de aislados según su CMI de ertapenem.

- Figura 24.** Porcentajes de aislados según su CMI, agrupados según sus zonas de procedencia y los medios de cultivo.
- Figura 25.** Porcentajes de aislados resistentes a distintas concentraciones de ertapenem.
- Figura 26.** Porcentajes de aislados resistentes a diferentes concentraciones de ertapenem según las muestras de procedencia.
- Figura 27.** Porcentajes de bacterias resistentes a diferentes concentraciones de ertapenem según el medio de cultivo.
- Figura 28.** Abundancia relativa de aislados resistentes a ertapenem según el género al que pertenecen.
- Figura 29.** Porcentajes de los aislados identificados resistentes a ertapenem agrupados según las zonas de muestreo y los medios de cultivo.
- Figura 30.** Porcentajes de aislados según su CMI de ertapenem.
- Figura 31.** Porcentajes de aislados según su CMI y agrupados según sus zonas de procedencia y los medios de cultivo.
- Figura 32.** Mecanismos de resistencia a carbapenemas dependientes de la entrada del antibiótico.

## Summary

The bacterial resistance to antibiotics is an ever increasing phenomena of great importance to human health that could be related to the use of antibiotics, but the origin of resistance could have been in environmental bacteria from which they could pass to pathogenic ones. In this Ph.D. Thesis we started a research project to study the possible relationship between the environmental and the clinical resistances. Thus, the abundance of bacteria resistant to each one of the ten tested common-used and one last-resort antibiotics was determined in two biological systems, one, the Huelva's estuary, a saline and with heavy metals contaminated environment, and the other, the Chorrera de Despeñalagua (Guadalajara), a fresh water and quasi-pristine one. Marine and nutritive agars were used for this purpose and levels of total, culturable and resistant bacteria to each antibiotic were determined. The relative abundances found were different for each antibiotic and environment, detecting in general the highest values for resistance to tetracycline (*Tc*), trimethoprim (*Tm*) or vancomycin (*Vm*) on the marine agar and for *Tm* and *Vm* on the nutritive one. 579 ampicillin resistant bacteria were isolated from the estuary and 505 from the Chorrera, which then were tested for resistance to the other ten antibiotics. We detected 143 and 92 multiresistance profiles, respectively. Multiple antibiotic resistance indexes (MAR) were calculated for each isolate and for groups of them based on their environmental origins and the media used for their isolation. We found the highest values for those isolates obtained on nutritive agar, or the sediments among those from the estuary, and for those obtained on marine agar among the ones from the Chorrera. In general the MAR indexes were high, corresponding to the resistance to more than half of the tested antibiotics. Isolates with different multiresistance profiles were phylogenetically assigned to the species level, affiliated to 8 classes, 51 genera and more than 80 species from the estuary and about 6 classes, 20 genera and almost 40 species from the Chorrera. Some of the found species have been reported as opportunistic human pathogens, or fish or plants pathogens. Certain genera showed intrinsic resistance to some antibiotics, while resistance to others could be acquired and perhaps, some of these, transferable to other bacteria, what still remains to be studied. Among the acquired resistances, some statistically significant associations between resistance to particular pairs of antibiotics in some genera have been found, indicating the existence of shared mechanisms of resistance, possible based on efflux pumps with antibiotic specificities still not described, or other mechanisms that are

## *Summary*

transferred together among species of the same genera or even among different genera through mobile genetic elements. In addition, the resistance of the isolates from both studied environments to ertapenem (*Ep*), a carbapenem antibiotic used for the treatment of certain serious infections, was tested. High numbers of isolates were resistant to this antibiotic, which also showed high minimal inhibitory concentrations (MIC) for these bacteria. During this project an effect of the marine agar on the activity of *Tc* and *Ep* was noticed, which could be related to bacteria adaptation mechanisms triggered by the higher osmolarity of this medium, which opens up opportunities for analyzing this issue in future projects.



## RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un fenómeno creciente e importante para la salud humana. Este crecimiento podría tener que ver con el uso de los antibióticos, pero el origen de las resistencias pudo estar en bacterias ambientales de las que en algún momento pudieron pasar a las patógenas. Esta tesis doctoral se ha desarrollado en el camino para estudiar la posible relación entre las resistencias ambientales y las clínicas, iniciando una línea de investigación en este campo en la que se ha determinado la abundancia de bacterias resistentes a diez antibióticos de uso común y otro de último recurso, en dos sistemas biológicos, uno, la ría de Huelva, salino y contaminado, y otro, la Chorrera de Despeñalagua (Guadalajara), de agua dulce y cuasi prístino. Se han empleado medios de cultivo nutritivo y marino y se han medido bacterias totales, cultivables y resistentes a cada antibiótico. La abundancia relativa de resistentes fue diferente para cada antibiótico y en cada sistema, observándose, en general, abundancias más elevadas para tetraciclina (*Tc*), trimetoprima (*Tm*) y vancomicina (*Vm*) sobre medio marino, y para *Tm* y *Vm* sobre nutritivo. Se han aislado 579 bacterias resistentes a ampicilina (*Ap*) de la ría y 505 de la Chorrera, de los que se ha determinado su resistencia a los otros diez antibióticos, detectándose 143 y 92 perfiles de multirresistencia respectivamente. Se han calculado los índices de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) de cada aislado y de grupos de ellos según su procedencia y medio de aislamiento, observándose valores superiores para los aislados sobre medio nutritivo, y para los del sedimento, entre los de la ría, y para los de marino en la Chorrera. En general los niveles de MAR observados fueron elevados correspondiendo a resistencia a más de la mitad de los antibióticos empleados. Se han identificado los aislados con distintos perfiles de multirresistencia hasta nivel de especie, asignándose a 8 clases, 51 géneros y más de 80 especies los de la ría y a 6 clases, 20 géneros y cerca de 40 especies, los de la Chorrera. Algunas de estas especies se han descrito como patógenos oportunistas en humanos, o patógenos de peces o plantas. Se ha determinado que algunos de los géneros tienen resistencia intrínseca a ciertos antibióticos mientras que otras serían adquiridas, y candidatas a ser transmisibles a otras bacterias, lo que está por determinar. Entre las últimas se han detectado algunas asociaciones estadísticamente significativas de dos antibióticos, que por ello podrían encontrarse en elementos genéticos móviles, o ser ambos sustrato de bombas de eflujo con especificidades no descritas. Adicionalmente se ha determinado la resistencia a ertapenem (*Ep*), un antibiótico empleado en el

## *Resumen*

tratamiento de ciertas infecciones graves, con una alta prevalencia de aislados *Ep*<sup>r</sup> con CMI<sub>s</sub> elevadas, en particular sobre medio marino. Durante estos estudios se ha detectado un efecto del medio marino sobre la resistencia a *Tc* y *Ep*, que podría estar relacionada con procesos de adaptación de las bacterias a la presión osmótica.

## 1. ***INTRODUCCIÓN***



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Los antibióticos

Uno de los grandes avances de la medicina moderna ha sido el descubrimiento y uso de sustancias que permiten controlar los procesos infecciosos. La era actual de la terapia antimicrobiana se inició en 1935 con el descubrimiento y uso de las sulfonamidas, seguida del uso clínico de la penicilina en 1940. Desde entonces, se han incorporado a la práctica clínica decenas de familias de antimicrobianos (Davies y Davies 2010).

El término antibiótico fue utilizado por primera vez por Selman Waksman en 1942 (Hotchkiss 2003) para describir sustancias producidas por microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Basándose en esta definición, a veces se hace distinción entre **antibióticos** y **quimioterapéuticos**, que serían, considerando su origen, los producidos por microorganismos y los sintetizados parcial o totalmente por el hombre respectivamente, aunque en la mayor parte de los casos todos ellos se consideran como antibióticos (Sengupta *et al.* 2013). Se conocen antibióticos que son capaces de actuar específicamente sobre eucariotas o sobre arqueas, o sobre eucariotas y procariotas, pero los de mayor interés son los que, por inhibir específica o cuasi específicamente organismos que infectan al hombre o animales, pueden ser utilizados para controlar infecciones fúngicas o bacterianas de éstos. Los más diversos y empleados son los antibacterianos. Además de para tratar infecciones, su aplicación también ha sido frecuente en ganadería como promotores de crecimiento, estimándose que el incremento en el uso de antibióticos en este campo seguirá aumentando en los próximos 15 años, a pesar de que en la Unión Europea el uso como promotores de crecimiento está prohibido desde 2006, pero no así en Estados Unidos (Economou y Gousia 2015).

Dependiendo del tipo de bacteria sobre el que se apliquen o de la concentración empleada, los antibióticos pueden tener un efecto **bacteriostático** o **bactericida** (Martínez-Martínez 2008). Además, existen antimicrobianos que actúan solo sobre bacterias grampositivas, otros que lo hacen sobre las gramnegativas y algunos que son capaces de actuar sobre

ambos tipos, aunque también su efecto puede ser mayor o menor sobre grupos de bacterias a niveles más específicos. El conjunto de bacterias o grupo de ellas sobre los que un antibiótico actúa es a lo que se denomina espectro de acción del antibiótico (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

Desde el descubrimiento de los antibióticos, históricamente se han realizado varias clasificaciones atendiendo a diferentes aspectos como por ejemplo: las fuentes de donde se obtienen, el tipo de efecto que producen, su espectro de acción, su mecanismo de actuación o su estructura química (tabla 1) (McManus 1997).

Ya que en este trabajo se han empleado antibióticos que se han elegido en base a su uso común en clínica y a que presentan diferentes mecanismos de actuación describiremos brevemente los principales.

#### **1.1.1. Mecanismo de actuación de los antibióticos**

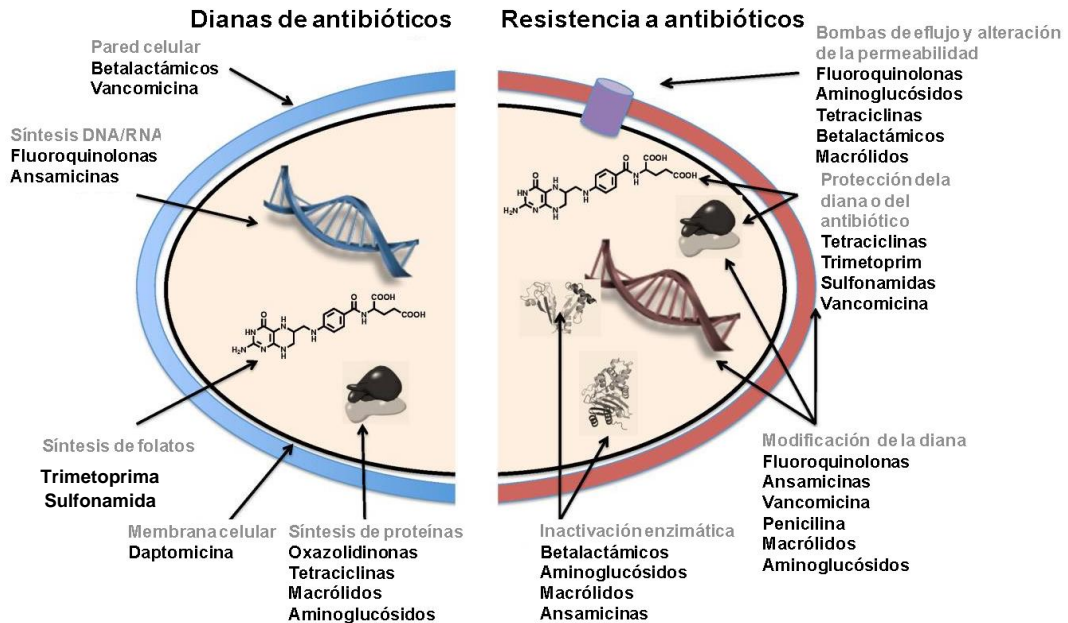
Para que un antibiótico sea efectivo contra las bacterias debe reconocer e interactuar de forma efectiva con una estructura o molécula diana a una concentración aceptable y no debe ser hidrolizado o transformado en un producto inactivo (Džidić *et al.* 2008). Los antibióticos actúan generalmente sobre una función biológica esencial para la vida o el crecimiento del microorganismo sobre el que es activo, lo cual depende de su estructura química y la capacidad de ésta para interactuar con alguna de las biomoléculas o estructuras involucradas en esa función (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

Los mecanismos de acción o las dianas de los antibióticos son muy variados (figura 1), pero los principales incluyen la inhibición de síntesis de la pared celular bacteriana, la alteración de la integridad de la membrana citoplasmática, la inhibición o alteración de la biosíntesis de proteínas, impidiendo la producción de proteínas u originando proteínas inactivas y el bloqueo de la síntesis o las funciones de los ácidos nucleicos (McManus 1997, Džidić *et al.* 2008). Algunas sustancias, a veces consideradas como antimicrobianos, y que se suelen usar acompañando a otros antibióticos, actúan en realidad protegiendo a estos últimos al inhibir los enzimas

bacterianos que destruyen o modifican el antibiótico e impiden su funcionamiento (Calvo y Martínez-Martínez 2009, Sengupta *et al.* 2013).

**Tabla 1.** Principales grupos de antibióticos y sus representantes. <sup>a</sup>Algunos autores consideran que cefoxitina y cefotetán se deben incluir en el grupo especial de cefamicinas, por las diferencias en su espectro de actividad con respecto al de las cefalosporina de segunda generación clásicas. Res.: resistente, gen.: generación at.: átomos. En rojo los antibióticos usados en este trabajo. Modificado de Calvo y Martínez-Martínez 2009.

MECANISMO DE ACCIÓN	GRUPOS		ANTIMICROBIANOS REPRESENTATIVOS
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	β-lactámicos	Penicilinas	Naturales: Penicilina G, penicilina V
			Res. a penicilinasas: Cloxacilina, meticilina, oxacilina
			Aminopenicilinas: <b>Ampicilina</b> , amoxicilina
			Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina
			Ureidopenicilinas: Mezlocilina, piperacilina
		Cefalosporinas	1ª gen.: Cefalotina, cefazolina
			2ª gen.: Cefaclor, cefotetán <sup>a</sup> , cefoxitina <sup>a</sup> , cefuroxima
			3ª gen.: Cefixima, cefotaxima, <b>ceftazidima</b> , ceftriaxona
			4ª gen.: Cefepima, cefpiroma
		Carbapenemas	Doripenem, <b>ertapenem</b> , imipenem, meropenem
	Monobactámicos	Aztreonam	
Glucopéptidos	<b>Vancomicina</b> , teicoplanina		
Bacitracina	Bacitracina		
Isoxazolidinonas	Cicloserina		
Fosfonopéptidos	Fosfomicina		
Alteración de la membrana citoplasmática	Polimixinas	Polimixina B, polimixina E (colistina)	
	Lipopéptidos	Daptomicina	
	Ionóforos	Tiroidinas	
	Formadores de poros	Gramicidinas	
Inhibición de la síntesis proteica	Ácido fusídico	Ácido fusídico	
	Aminoglicósidos	<b>Estreptomicina</b> , gentamicina, <b>kanamicina</b> , tobramicina	
	Anfenicoles	<b>Cloranfenicol</b> , tiamfenicol	
	Estreptograminas	Quinupristina-dalfopristina	
	Lincosamidas	Clindamicina, limcomicina	
	Macrólidos	14 at. de C: Claritromicina, <b>eritromicina</b> , roxitromicina	
		15 at. de C: Azitromicina (azálidos)	
		16 at. de C: Espiramicina, josamicina, midecamicina	
		Cetólidos: Telitromicina	
	Mupirocina	Mupirocina	
	Oxazolidinonas	Linezolid	
Tetraciclinas	Doxiclina, minociclina, oxitetraciclina, <b>tetraciclina</b>		
Gliciliclinas	Tigeciclina		
Alteración del metabolismo o de la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas	1ª gen.: <b>Ácido nalidixico</b> , ácido pipemídico	
		2ª gen.: Norfloxacinó	
		3ª gen.: Ciprofloxacino, levofloxacino	
		4ª gen.: Gemifloxacino, moxifloxacino,	
	Rifamicinas	<b>Rifampicina</b>	
	Nitroimidazoles	Metronidazol, ornidazol, tinidazol	
Nitrofuranos	Furazolidona, nitrofurantoína		
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas	Sulfametoxazol	
	Diaminopirimidinas		
		<b>Trimetoprima</b>	



**Figura 1.** Dianas de los antibióticos y mecanismos de resistencia. Modificado de Wright 2010a.

#### 1.1.1.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta la presión osmótica interna. La ausencia de esta estructura da lugar a la lisis celular del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano (Dover *et al.* 2007).

La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplasmática, donde se sintetizan los precursores del peptidoglicano, el transporte de éstos a través de la membrana citoplasmática, y la organización final de la estructura del peptidoglicano, que se desarrolla en la parte más externa (Calvo y Martinez-Martinez 2009).

Los **antibióticos betalactámicos** inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la interferencia con las transpeptidasas conocidas como *Penicillin Binding Proteins* (PBPs, proteínas de unión de penicilina) requeridas para la síntesis de la cadena de peptidoglicano.

Otros antibióticos que actúan sobre la síntesis de la pared celular tienen otros mecanismos de actuación y así: la **vancomicina** y la **teicoplanina** ejercen su acción mediante unión al dipéptido D-alanil-D-alanina terminal de la cadena de peptidoglicano naciente, impidiendo de esta forma la etapa de entrecruzamiento requerida para la estabilidad de la pared celular sintetizada (McManus, 1997, Džidić *et al.* 2008, Calvo y Martínez-Martínez 2009). La **telavancina** es un lipoglicopéptido bactericida que inhibe la biosíntesis de peptidoglicano a través de la orientación preferencial de la transglicosilación (Benton *et al.* 2007). La **fosfomicina** (análogo del fosfoenolpiruvato) inhibe la síntesis de peptidoglicano mediante su unión a la piruviltransferasa, enzima necesario para la síntesis del uridindifosfato-N-acetilmurámico precursor del peptidoglicano (Calvo y Martínez-Martínez 2009). Finalmente, la **bacitracina** actúa uniéndose e inhibiendo la defosforilación del transportador (Pirofosfato lipídico) del disacárido-pentapéptido precursor a través de la membrana citoplasmática y hasta la pared en formación (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

Es importante resaltar que para que estos antimicrobianos puedan ser eficaces las bacterias han de hallarse en fase de división celular, ya que es cuando tiene lugar la síntesis del peptidoglicano (Suárez y Gudíol 2009).

Algunas sustancias como el **ácido clavulánico**, el **sulbactam** y el **tazobactam**, que generalmente carecen de acción antibacteriana intrínseca de verdadera importancia clínica, son inhibidores de algunas betalactamasas, a las que se unen irreversiblemente, impidiendo la acción de éstas sobre los antibióticos betalactámicos, y con frecuencia se emplean acompañando a éstos. Se ha demostrado que el sulbactam es además activo por sí mismo contra *Acinetobacter baumannii* (Georgopapadakou 2004).

#### 1.1.1.2. Alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática

Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas incluso en bacterias sin crecimiento activo y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas al compartir ambos tipos de



células componentes de la membrana citoplasmática (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

Aunque no está del todo claro su mecanismo de acción, se postula que las **polimixinas** ejercen sus efectos inhibitorios mediante el incremento de la permeabilidad de la membrana bacteriana provocando fugas del contenido citoplasmático, que terminan matando la célula (Tenover 2006). La **daptomicina** por su parte, muestra una rápida actividad bactericida a través de la unión, dependiente de calcio, a la membrana formando un oligómero. Esta unión da lugar a un flujo de salida de potasio de la célula con la consecuente muerte celular (Tenover 2006, Beiras-Fernandez *et al.* 2010).

#### **1.1.1.3. Inhibición de la síntesis de proteínas**

Existen numerosos antibióticos que actúan a este nivel ya que es uno de los procesos más complejos que se dan en la célula e involucra numerosas biomoléculas y varios sitios activos que pueden ver afectada su función en presencia de diversas sustancias. Ya que la estructura y mecanismos involucrados en la síntesis de proteínas en eucariotas y bacterias presenta diferencias diversas, es posible la utilización de sustancias antibióticas que generen la inhibición selectiva de la síntesis de proteínas bacteriana, y por tanto su uso en clínica para la lucha contra las infecciones producidas por bacterias (Tenover 2006).

Los antibióticos que actúan a este nivel se suelen clasificar en familias según sus estructuras. Los **macrólidos** (antibióticos con anillos macrocíclicos de lactona), entre los que se encuentra la **eritromicina** (*Em*), se adhieren a la subunidad ribosomal 50S e interfieren en la fase de elongación de la cadena del polipéptido en crecimiento. Los **aminoglicósidos**, como por ejemplo la **kanamicina** (*Km*) y la **estreptomicina** (*Sm*), inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad 30S del ribosoma, afectando a la iniciación de la traducción y produciendo en algunos casos errores de lectura del ARNm. El **cloranfenicol** (*Cc*) ejerce su acción afectando a la unión específica del ARNr 23S en la subunidad 50S, bloqueando la actividad peptidiltransferasa

y, con ello, la elongación de la cadena peptídica (Retsema y Fu 2001). Las tetraciclinas, entre ellas la **tetraciclina** (*Tc*) propiamente dicha, se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma, bloqueando el acceso de los aminoacil-ARNt, e impidiendo la continuación de la síntesis proteica (Shlaes 2006).

#### 1.1.1.4. Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos

La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos. La mayoría de los antibióticos que intervienen sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes del inóculo y de la fase de crecimiento bacteriano (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

Las **quinolonas**, como por ejemplo el **ácido nalidíxico** (*Nx*), ejercen su acción inhibiendo a las topoisomerasas de tipo II como la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, mediante su unión al complejo enzima-ADN, formando de forma irreversible un complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa, e impidiendo que el proceso de transcripción o replicación continúen (Drlica y Zhao 1997). Su acción sobre las topoisomerasas no explica por sí sola su potente acción bactericida, sino que ésta se debe a fenómenos secundarios mal conocidos, entre los que la activación del sistema SOS de reparación parece desempeñar un papel importante (Drlica *et al.* 2008). Por lo general, los antibióticos de este grupo no son particularmente selectivos en su acción y comportan cierta toxicidad para las células eucariotas (Calvo y Martínez-Martínez 2009).

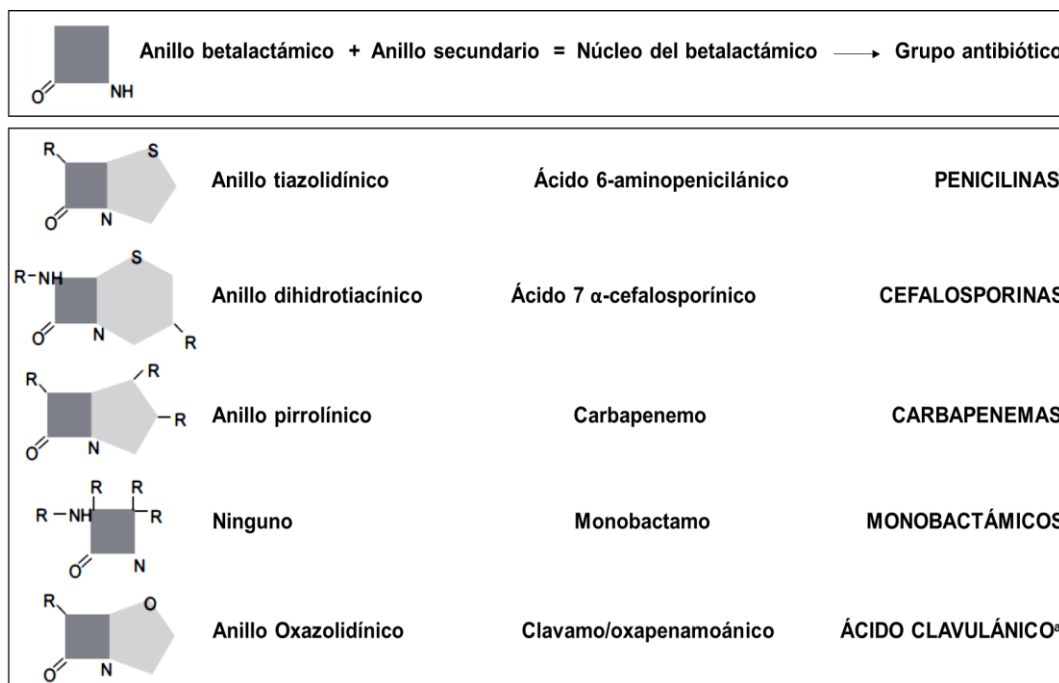
Las **rifamicinas**, como la **rifampicina** (*Rp*), bloquean la subunidad beta de la ARN polimerasa bacteriana y de esta manera la síntesis de los distintos tipos de moléculas de ARN necesarias para el funcionamiento celular (Villain-Guillot *et al.* 2007).

Las **sulfamidas** son análogos del ácido paraminobenzoico, y por tanto, compiten por el enzima dihidropteroatosintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico.

Las **diaminopirimidinas**, como la **trimetoprima** (*Tm*) y la pirimetamina, compiten con el ácido dihidrofólico por la unión al enzima dihidrofolatoredutasa al que el enzima convierte en ácido tetrahidrofólico, un cofactor necesario para la síntesis del dTTP, cuya baja concentración impide en última instancia la síntesis del ADN (Tenover 2006, Džidić *et al.* 2008, Calvo y Martinez-Martinez 2009).

### 1.1.2. Los antibióticos betalactámicos

Los betalactámicos pertenecen al grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico, lo que determina su mecanismo de acción (figura 2). No obstante, la actividad del anillo betalactámico requiere de la unión a otros radicales, normalmente otros anillos. Esta asociación a otros radicales junto con las características propias, modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: **penicilinas**, **cefalosporinas**, **carbapenemas** y **monobactámicos**, y de **inhibidores de betalactamasas** (Suárez y Gudiol 2009).



**Figura 2.** Estructuras químicas de los principales tipos de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas. <sup>a</sup> Todos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico. Tomado de Suárez y Gudiol 2009.

Como ya se ha comentado, el mecanismo de acción de esta familia es la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano y, por lo tanto, la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana con un efecto bactericida. También pueden actuar activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Ginsburg 2002).

El espectro de acción de los antibióticos betalactámicos incluye bacterias grampositivas y gramnegativas. Sin embargo, no son efectivos sobre los micoplasmas ya que éstos carecen de pared celular. Tampoco funcionan sobre bacterias intracelulares como las de los géneros *Chlamidia* y *Rickettsia* (Calvo y Martínez-Martínez 2009, Suárez y Gudíol 2009).

## 1.2. Función de los antibióticos en la naturaleza

Estudios recientes revelan que bajo condiciones limitadas de nutrientes, los microorganismos inician la secreción de metabolitos secundarios que son un conjunto diverso de moléculas orgánicas de bajo peso molecular, conocidos como **parvoma** (Davies 2011). Aun no se conoce la función ecológica de la gran mayoría de dichas moléculas. En sólo una pequeña fracción de éstas, ha sido identificada una actividad antibiótica, a la que originalmente no se le atribuyó ningún papel biológico relevante en los organismos productores (Waksman 1961) y cuya función en la naturaleza aún está por esclarecer (Davies 2006).

Se ha visto que los genes implicados en la biosíntesis de antibióticos y aquellos responsables de su resistencia se desarrollaron miles de años antes de que los antibióticos se introdujeran en la práctica clínica. De ahí que se haya deducido que tanto los antibióticos como su resistencia tienen alguna función en la propia fisiología bacteriana de los productores o en la ecología de los ecosistemas en los que se encuentran (Sengupta *et al.* 2013).

Existen evidencias que sugieren que los antibióticos pueden ejercer funciones como moléculas de señalización que pueden intervenir en procesos celulares como la reparación del ADN, la transcripción o la

biosíntesis de proteínas (Tsui *et al.* 2004, Davies 2006, Sengupta *et al.* 2013).

A nivel ecológico se les ha atribuido un papel en la competición entre especies, aunque solo en pocos casos concretos ha sido posible demostrarlo (Sengupta *et al.* 2013). También se ha visto que muchos antibióticos poseen actividad de feromona sexual al estimular en varios órdenes de magnitud la conjugación bacteriana (Evans y Dyke 1988). En algunos casos se ha visto un papel de ciertos antibióticos en los fenómenos de *quorum sensing* (Skindersoe *et al.* 2008). Entre otras funciones, algunos antibióticos, a las bajas concentraciones en que se encuentran en la naturaleza, pueden afectar la expresión de genes específicamente relacionados con la virulencia, la motilidad, la promoción o inhibición de la formación de biofilms, e incluso promover reordenamientos genómicos y mutagénesis (Sengupta *et al.* 2013). Este fenómeno se conoce como **hormesis**, dado que las actividades de los antibióticos dependen de las concentraciones en las que se encuentran (Calabrese 2013).

### 1.3. Resistencia a los antibióticos

Desde el punto de vista de la ecología microbiana la resistencia a los antibióticos se puede describir como un fenómeno mediante el cual un fenotipo hace a los microorganismos menos susceptibles que otros de la misma especie, independientemente del nivel de resistencia. A nivel clínico, se considera una definición en términos más absolutos, considerando la resistencia como un fenómeno que hace que los microorganismos resistentes no sean susceptibles a ser eliminados o contenidos (Cantón y Morosini 2011), basándose en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Martínez *et al.* 2015). Debido a la emergencia de fenotipos multirresistentes en los ambientes clínicos (bacterias resistentes a tres o más antibióticos) (Tenover 2006), ha aumentado notablemente la preocupación de los expertos por la aparición de las llamadas **superbacterias** (“superbugs”), bacterias con elevados niveles de resistencia a la mayoría de los antibióticos recomendados para el tratamiento de las infecciones que producen y con altos índices de morbilidad y mortalidad (Davies y Davies 2010).

Aunque el estudio de la resistencia a los antibióticos se ha centrado más en los patógenos bacterianos encontrados en pacientes de hospitales, de animales o de plantas con efectos adversos en la agricultura, está ampliamente aceptado que los genes de resistencia a los antibióticos tienen sus orígenes en bacterias medioambientales (Davies 1994, Blair *et al.* 2015). Estudios realizados con microorganismos aislados procedentes de ambientes prístinos, en los que se incluyen cuevas y permafrost, demostraron que la resistencia surgió mucho tiempo antes de la introducción de los antibióticos en la actividad humana (D'Costa *et al.* 2011, Bhullar *et al.* 2012). Además, se ha planteado que, en ocasiones, los genes de resistencia podrían cumplir una función diferente a la propia de resistencia, siendo movilizados desde reservorios genéticos ambientales y difundiéndose entre bacterias comensales y patógenos taxonómicamente divergentes (Martínez *et al.* 2007).

Recientes estudios han demostrado que algunos de los determinantes de la resistencia a antibióticos en bacterias patógenas encontradas en ambientes clínicos se encuentran también en el medio ambiente (Forberg *et al.* 2012, Yang *et al.* 2013). Existen evidencias de que factores antropogénicos como la emisión al medio ambiente de antibióticos y otras sustancias contaminantes (por ej. metales pesados), pueden favorecer la co-selección, originando cambios significativos en la microbiota bacteriana natural (Seiler y Berendonk 2012, Li *et al.* 2015). No se conoce aún suficientemente bien a qué concentraciones de estos antibióticos y otras sustancias están expuestas las bacterias en el medio ambiente (Alonso *et al.* 2001, Andersson y Hughes 2014). El papel de la acción humana en la emergencia de la resistencia a antibióticos no es universalmente aceptada y es controvertida (Bhullar *et al.* 2012).

Recientemente ha surgido el concepto del **resistoma antibiótico** (figura 3) que comprende el conjunto de todos los genes que contribuyen directa o indirectamente a la resistencia a los antibióticos. Dicho resistoma antibiótico estaría constituido por: a) los genes de resistencia de los microorganismos ambientales, muchos de ellos procedentes del suelo, tanto

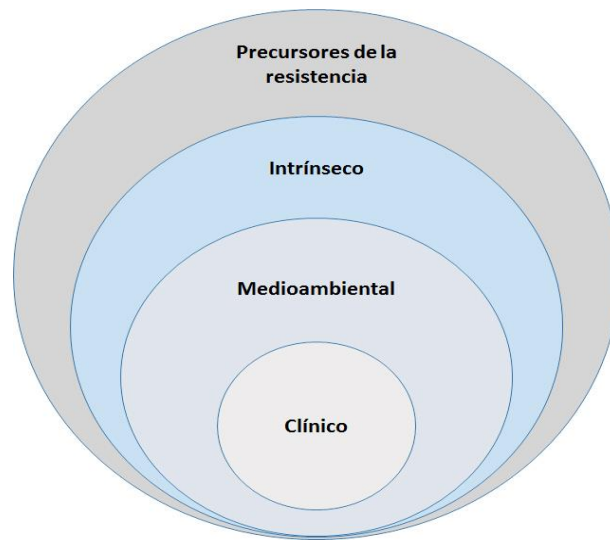
productores como no productores de antibióticos (**resistoma ambiental**), b) los genes de resistencia de las bacterias patógenas (**resistoma clínico**), c) los genes intrínsecos presentes en los cromosomas bacterianos que contribuyen a la resistencia (**resistoma intrínseco**) y d) los genes que codifican proteínas metabólicas, pero que podrían ser los precursores de genes de resistencia a través de procesos evolutivos y que han sido denominados **genes de protorresistencia** (Wright 2010b).

### **1.3.1. Mecanismos moleculares de la resistencia a los antibióticos**

Las bacterias, por su gran capacidad de adaptación, pueden desarrollar diferentes mecanismos de resistencia frente a los antibióticos (figura 2):

#### **1.3.1.1. Resistencia intrínseca**

La resistencia intrínseca es la capacidad de especies bacterianas para resistir la acción de uno o varios antibióticos como resultado de sus características estructurales o funcionales inherentes y cuyos genes se encuentran en el cromosoma. Ejemplo de ello puede ser la impermeabilidad de la pared celular a los antibióticos, la carencia de dianas moleculares de éstos, la inactivación del antibiótico mediante hidrólisis o su modificación, o la existencia de mecanismos más o menos inespecíficos de eliminación de la droga cuando ésta entra en la célula, como es el caso de bombas de membrana que expulsan los antibióticos confiriendo resistencia simultánea a múltiples antibióticos (Aleksun y Levy 2007, Cox y Wright 2013, Blair *et al.* 2015).



**Figura 3.** El resistoma antibiótico Modificado de Wright 2010b).

#### 1.3.1.2. Resistencia adquirida

En algunas bacterias pueden aparecer fenotipos resistentes como consecuencia de la mutación cromosómica y la selección (**evolución vertical**) y/o la adquisición de nuevo material genético procedente de otros organismos resistentes (**evolución horizontal**), pudiendo ocurrir ésta entre cepas de la misma especie o entre especies o géneros bacterianos diferentes. Estos cambios pueden producir consecuencias relacionadas con fenómenos similares a los descritos como resistencia intrínseca (McManus 1997, Tenover 2006, Bockstael y Van Aerschot 2009).

#### 1.3.1.3. Resistencia a los antibióticos betalactámicos

La presencia de membrana externa en las bacterias gramnegativas dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas como los betalactámicos, que necesitan utilizar poros proteicos (porinas) para tal fin, de forma que en algunas ocasiones la resistencia se genera como consecuencia de alteraciones en dichas porinas que impiden la entrada de los antibióticos. Por otro lado, los betalactámicos han de unirse a las PBPs para ejercer su efecto bactericida y, por tanto, cambios en las estructuras de las PBPs (mutaciones, hiperexpresión o modificación de la afinidad) podrían implicar



una pérdida de su afinidad por estos antibióticos, no pudiendo éstos ejercer su acción inhibitoria (Suárez y Gudíol 2009).

En ciertos bacilos gramnegativos, especialmente en *Pseudomonas aeruginosa*, se ha observado la existencia de bombas de membrana que pueden expulsar el antibiótico con gasto energético (transporte activo), dando lugar a fenotipos de resistencia (Marín y Gudíol 2003, Poole 2005).

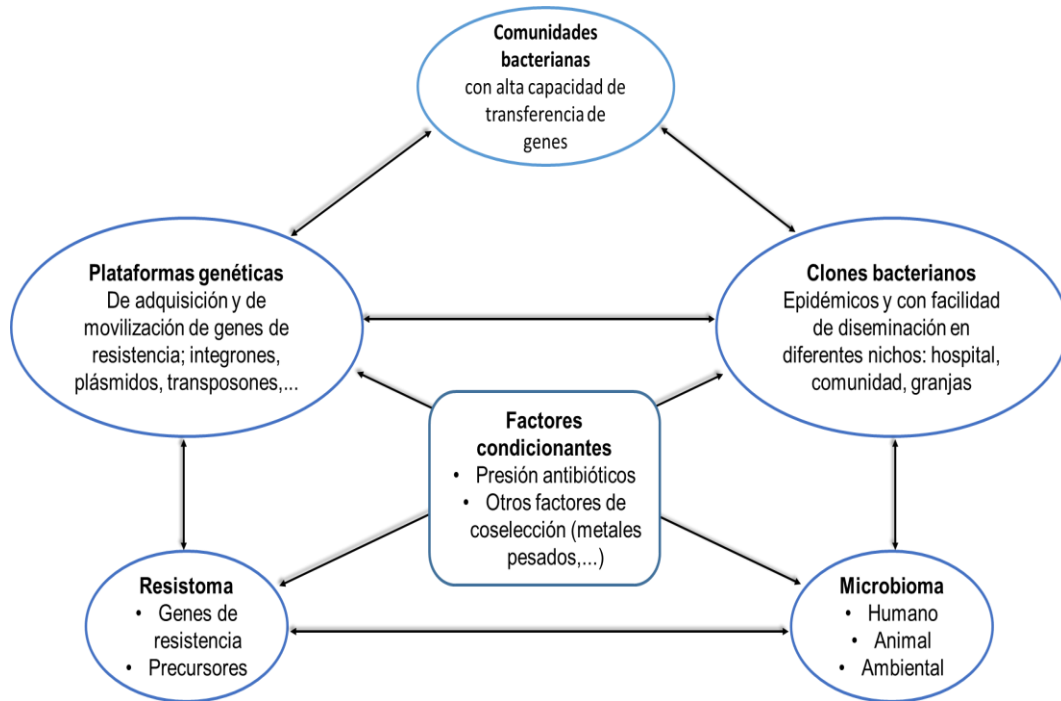
A pesar de todos estos mecanismos de resistencia, el más relevante es la inactivación del propio antibiótico por la acción de enzimas que actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, lo que impide su unión a las PBPs. Estas enzimas, denominados en general **betalactamasas ( $\beta$ -lactamasas)**, muestran una enorme diversidad en su estructura primaria y se han descrito más de 400 tipos que, aunque comparten el mecanismo general de acción, difieren en el tipo de sustratos que reconocen y en su susceptibilidad a sustancias inhibitoras. En particular, las llamadas **betalactamasas de espectro extendido** (BLEEs o ESBLs) actúan sobre un amplio rango de sustratos y están constituyendo un grave problema epidemiológico global desde principios de los años 90 del siglo pasado (Guenther *et al.* 2011).

La mayoría de las resistencias a carbapenemas esta mediada en gran medida por la producción de **carbapenemasas**, las cuales son capaces de hidrolizar no solo las carbapenemas sino también todos los demás antibióticos betalactámicos (Okochi *et al.* 2015). Las carbapenemasas más comunes incluyen los diferentes tipos de **VIM** (Veronica Integron Metallo-beta-lactamases), **IMP** (Imipenemase), **KPC** (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), **OXA-48** (Oxacillinase-48) y **NDM-1** (New Delhi Metallo-beta-lactamase-1) (Nordmann *et al.* 2011).

### 1.3.2. Diseminación de la resistencia

Existe un continuo flujo e intercambio de bacterias resistentes y de genes de resistencia entre los diferentes ecosistemas (humano, animal, acuático, terrestre, etc.) y cada vez más, entre países (Allen *et al.* 2010). Por otro lado, las bacterias ambientales actúan como un reservorio ilimitado de genes que, en ocasiones, funcionan como genes de resistencia a

antibióticos y que podrían pasar a bacterias patógenas una vez que entren en contacto, constituyendo por ello un potencial riesgo para alcanzar el éxito



**Figura 4.** Factores implicados en la aparición y diseminación de las resistencias a antibióticos. Modificado de Torres 2012.

durante el tratamiento de las infecciones bacterianas (Baquero *et al.* 2008, Blair *et al.* 2015) (figura 4).

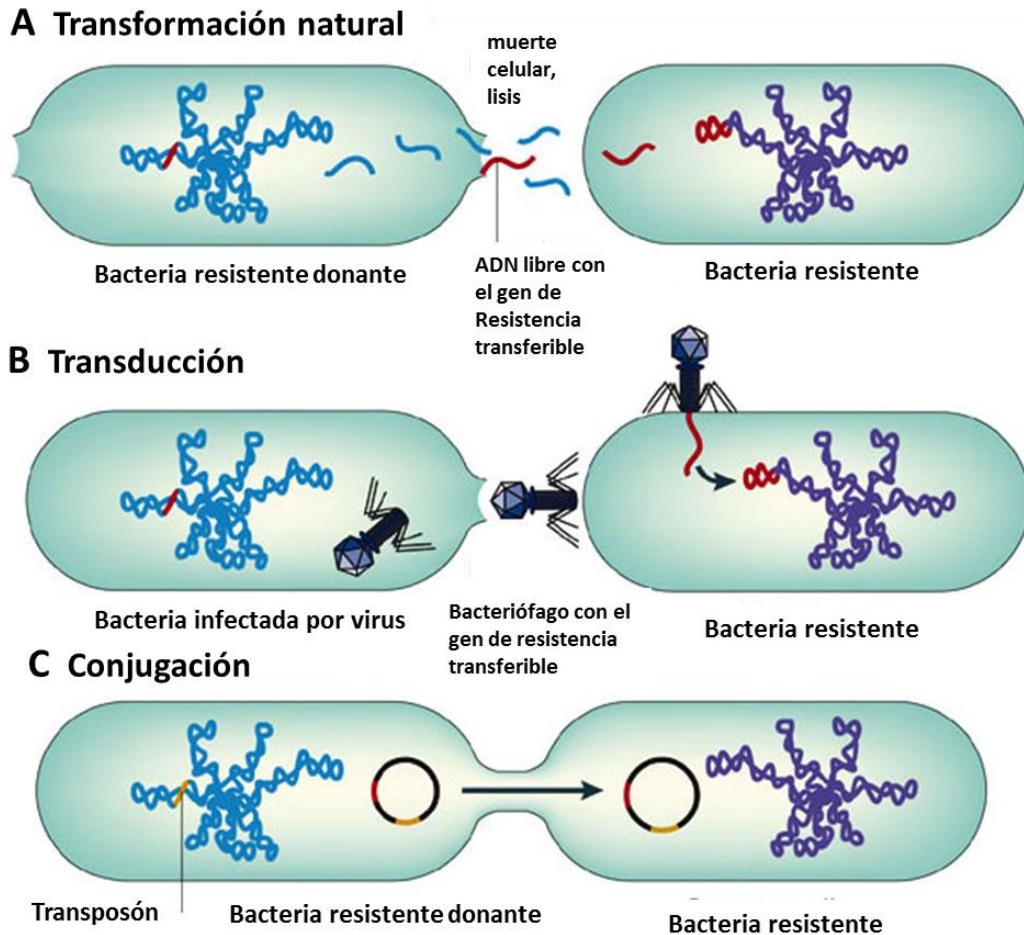
Un papel importante en la difusión de los fenotipos resistentes son los fenómenos de la **transferencia horizontal de genes** (HGT) entre los microorganismos que portan estos genes y los que no en un ambiente selectivo. De hecho, se considera que la evolución bacteriana está marcada por el incremento de la diversidad genética a causa de la HGT (Aminov 2011). Además de su implicación en la transferencia de genes de resistencia, la HGT también se relaciona con procesos celulares más complejos como la patogenicidad (Kado 2009).

En los procesos de HGT se pueden reclutar y transferir elementos genéticos como plásmidos, integrones, cassettes génicos, transposones, secuencias de inserción (IS), islas genómicas, elementos conjugativos integrativos (ICE), bacteriófagos y agentes de transferencia génica (GTA) (tabla 2) (Soucy *et al.* 2015).

**Tabla 2.** Propiedades de los elementos genéticos implicados en HGT y en reclutamiento de genes.

Elementos Genéticos	Propiedades
<b>Plásmidos</b>	Replicones extracromosomales lineales o circulares, autotransferibles o movilizables. Vehículos de transmisión de información genética en un amplio rango de especies bacterianas.
<b>Integrones</b>	Elementos dinámicos capaces de capturar material genético exógeno ( <i>cassettes</i> de genes), integrándolos mediante recombinación sitio-específica y expresándolos de forma eficiente. Generalmente asociados a transposones o plásmidos.
<b>Transposones</b>	Elementos genéticos que pueden moverse dentro o entre replicones por la acción de la transposasa. Flanqueados por regiones invertidas y repetidas. Usualmente llevan genes de resistencia a los antibióticos.
<b>Islas genómicas</b>	Partes de regiones cromosomales adquiridas por HGT y flanqueadas por regiones repetitivas. Contienen genes para la inserción y escisión cromosomal.
<b>ICE</b>	Elementos conjugativos autotransferibles que se integran en el genoma de los hospedadores como los transposones y que pueden facilitar la movilización de islas genómicas por medio de regiones de integración conservadas.
<b>Bacteriófagos</b>	Virus que infectan bacterias y pueden integrarse en el genoma del hospedador o escindirse de él llevando material genético de la bacteria.
<b>GTA</b>	Agentes de transferencia génica, evolucionados a partir de profagos pueden transportar fragmentos de genes de una bacteria a otra encapsulados en forma infectiva, pero no incluyen todo su genoma.

La transferencia de estos elementos entre bacterias puede darse mediante procesos como y la transformación (incorporación de segmentos de ADN libre en plásmidos o en el cromosoma), la transducción (transferencia de ADN de una célula a otra a través de infección por bacteriófagos), la conjugación (transferencia de material genético con contacto directo entre las células donante y receptora), y la transferencia por infección por GTAs empaquetados (similar a la transducción aunque diferente) (figura 5).



**Figura 5.** Mecanismos generales mediante los cuales puede ocurrir la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos. Modificado de Furuya y Lowy 2006.

A pesar de la importancia de la HGT, poco se sabe sobre el tráfico de genes que podría realizarse en ambientes naturales (Davies 1994, Wolska 2003, Aminov 2011). Sobre la HGT pueden influir varios factores, entre los cuales están los antibióticos como ciprofloxacino (fluoroquinolonas), cefalosporinas (betalactámicos) y estreptomicina (aminoglicósidos) que promueven la transferencia de sus propios genes de resistencia entre distintas bacterias (Hochhut *et al.* 2001, Beaber *et al.* 2004, Hocquet *et al.* 2012, Andersson y Hughes 2014). Se ha visto que concentraciones subinhibitoria de antibióticos puede estimular la HGT mediante la inducción de la respuesta SOS (Andersson y Hughes 2014) o la recombinación de integrones de clase 1 (Partridge *et al.* 2009).

### 1.3.3. Función de la resistencia a antibióticos en la naturaleza

La resistencia a antibióticos posee unas propiedades altamente pleiotrópicas (Davies y Davies 2010). Se sabe que la resistencia intrínseca está ampliamente extendida en la naturaleza existiendo un resistoma intrínseco que consta de genes de variado origen filogenético con un alto grado de inespecificidad. Muchas de las proteínas codificadas por estos genes están implicadas en procesos fisiológicos básicos en un ecosistema natural (Fajardo *et al.* 2008).

Los antibióticos, entre otros compuestos presentes en el medio ambiente de forma natural o promovida por la acción humana, pueden actuar como interruptores de algunas funciones fisiológicas de forma que la aparición de fenotipos resistentes a estos compuestos podría ser la consecuencia lógica de su actividad selectiva. Una vez generadas, estas resistencias podrían ser transmitidas a otras bacterias sin un contacto directo con los antibióticos (Perry y Wright 2014).

Algunos estudios han descrito que algunos determinantes de resistencia pueden ejercer otras funciones en la célula (Martínez 2013). Así por ejemplo, Krulwich y cols. (2001) demostraron que los determinantes de resistencia a tetraciclina Tet (L) y Tet (K) catalizan el intercambio de protones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , fundamental en la fisiología bacteriana ya que mantiene la polaridad de la célula, y en *Mycobacterium tuberculosis*, la bomba de expulsión P55 juega un papel en la respuesta al estrés oxidativo y en el crecimiento celular *in vitro*, además de contribuir a su fenotipo de resistencia (Ramón-García *et al.* 2009).

La mayoría de las cepas productoras de antibióticos contienen genes de resistencia al antibiótico concreto que producen y éstos generalmente están físicamente asociados a los genes de la ruta de biosíntesis del antibiótico, asegurando su expresión cuando el antibiótico es producido (Hopwood 2007, Tahlan *et al.* 2007, Thaker *et al.* 2014). Un ejemplo de esto es *Streptomyces coelicolor* en el que el gen que codifica para la proteína que permite la expulsión de actinorhodina se encuentra incrustado en los de la vía de biosíntesis del antibiótico, lo que sugiere que el determinante de la resistencia podría incluso tener algún papel en la

biosíntesis del propio antibiótico (Allen *et al.* 2010). Los genes de resistencia en estos organismos productores tendrían la función de permitir su producción sin afectar al organismo productor. Por otro lado, estos genes podrían en algunos casos ser transmitidos a otras bacterias no productoras, permitiendo la supervivencia de éstas y alterando el sistema ecológico.

#### **1.4. Antecedentes de nuestro estudio**

Se ha visto que la presencia de antibióticos en el medio ambiente puede alterar sus poblaciones microbianas seleccionando microorganismos resistentes (Baquero *et al.* 2008), siendo posible que los ecosistemas acuáticos o terrestres sean reservorios de genes de resistencia a antibióticos (Marti *et al.* 2014). Por esto se ha considerado que la existencia de estas bacterias resistentes en estos ecosistemas puede constituir una clara amenaza para la salud pública (Threlfall 2002, Tian *et al.* 2009). Por una parte, la mezcla en el agua de bacterias procedentes de animales, humanos y del medio ambiente origina una evolución de la resistencia debido al intercambio de genes entre las mismas (Baquero *et al.* 2008, Martínez 2009a), haciendo que bacterias ambientales puedan adquirir resistencias habituales en medios clínicos, y por otra parte se ha visto que al menos algunas resistencias detectadas en medios clínicos pueden tener su origen en genes procedentes de bacterias ambientales (Humeniuk *et al.* 2002, Cantón 2009, Forsberg *et al.* 2012, Perry y Wright 2013). Algunos autores han indicado, sin embargo, que pueden existir ciertos cuellos de botella para la estabilización de estos genes ambientales en bacterias patógenas (Thomas y Nielsen 2005, Martínez 2012), aunque también se han propuesto sistemas de transferencia horizontal de genes que podrían soslayar esas restricciones (Muniesa *et al.* 2013, Marti *et al.* 2014). El origen ambiental de los genes de resistencia a antibióticos es generalmente considerado el más probable para los encontrados en ambientes clínicos, pero solo algunos casos han sido fehacientemente demostrados (Perry y Wright 2013). Por estas razones, el estudio de la resistencia a antibióticos de bacterias de sistemas biológicos ambientales alterado o prístino es de gran interés.

Existen pocos estudios sobre la abundancia y diversidad de bacterias resistentes a los antibióticos en medios acuáticos prístinos (Brown y Balkwill 2009, Dib *et al.* 2009, Voolaid *et al.* 2012) o incluso contaminados, p. ej. con metales pesados (Baker-Austin *et al.* 2006, Seiler y Berendonk 2012), siendo algo más frecuentes los estudios de este tipo realizados sobre aguas residuales (p.ej. Schwartz *et al.* 2003, Baquero *et al.* 2008) u otros ambientes con influencia antropogénica de distinto tipo (p. ej. Li *et al.* 2009, Martínez 2009b, Huang *et al.* 2015), o de medios terrestres (p.ej. D'Costa *et al.* 2007, Nesme y Simonet 2015). En general, buena parte de los estudios realizados han tenido un enfoque clínico estudiando solo algunas especies bacterianas consideradas como posiblemente patógenas o considerando un muy limitado número de antibióticos (Blasco *et al.* 2008). Con las limitaciones indicadas, que cada estudio pueda tener, y el bajo número de éstos que se han realizado, parece ser que las bacterias resistentes a antibióticos son abundantes tanto si el sistema es prístino (Bhullar *et al.* 2012) como si es contaminado (Goñi-Urriza *et al.* 2000), y que la **multirresistencia** a antibióticos no es solo una propiedad de bacterias patógenas sin que también se puede encontrar en bacterias medioambientales (Blasco *et al.* 2008, Laroche *et al.* 2009), incluso en ambientes con ninguna o baja influencia antropogénica (Brown y Balkwill 2009, Dib *et al.* 2009, Voolaid *et al.* 2012).

Mayor número de estudios se han enfocado en el análisis de la presencia y diversidad de los genes de resistencia en el medio ambiente (p.ej. Szczepanowski *et al.* 2009, Drudge *et al.* 2012, Amos *et al.* 2014, Li *et al.* 2015), encontrándose que la diversidad de éstos es mayor que la encontrada entre las bacterias patógenas o incluso que en ambientes contaminados con antibióticos (Nesme *et al.* 2014).

A la luz de estos resultados, se puede apreciar que para el estudio de la resistencia a antibióticos en el medio ambiente y su posible papel en el desarrollo de resistencias en ambientes clínicos, tanto los estudios basados en cultivo, como los metagenómicos pueden aportar valiosa información (Perry y Wright 2013). La utilización de los primeros ha sido poco habitual hasta el momento, posiblemente por ser metodologías que suponen un

arduo trabajo, que solo se puede llevar a cabo sobre una parte de la población de bacterias resistentes que puedan existir en un determinado ambiente, ya que las técnicas dependientes de cultivo están intrínsecamente limitadas por el hecho de que solo un porcentaje muy bajo de las bacterias ambientales son cultivables en el laboratorio (Amann *et al.* 1995). Por el contrario las técnicas metagenómicas, que analizan la presencia de genes de resistencia a los antibióticos, tiene la ventaja de que, en principio, permitirían la detección de diversos genes procedentes posiblemente de un mayor número y diversidad de bacterias. Sin embargo, otros factores deben ser tenidos en cuenta. Entre estos, que los métodos basados en cultivo permiten determinar en qué bacterias concretas se encuentran los determinantes de resistencia una vez que han sido aisladas, así como estudiar los niveles de multirresistencia que también son de interés cuando se pretende determinar su posible transmisión a otras especies en contacto con el hombre, los animales o las plantas, así como aislar y diseccionar los elementos genéticos portadores de los genes de resistencia y, estudiando estos, estimar sus posibilidades de transmisión. Los estudios metagenómicos, sin embargo, solo permiten la determinación de la presencia de genes fuera de su contexto biológico y teniendo que utilizar métodos de amplificación de los genes que requieren la utilización de secuencias ya conocidas de éstos sin mucha flexibilidad en la estructura de las mismas. Estas metodologías no permitirían la detección de genes no previamente descritos, o al menos no muy similares a los conocidos, y que pudieran ser responsables de resistencias producidas por mecanismos aún desconocidos. Las técnicas de metagenómica funcional podrían paliar en parte este problema (Riesenfeld *et al.* 2004, Allen *et al.* 2009, Torres-Cortés *et al.* 2011, Forsberg *et al.* 2015), si bien los genes de resistencia nuevos deberían poder ser expresados adecuadamente y ser funcionales en las bacterias utilizadas para su detección, lo que exigiría el uso de varios sistemas de expresión (Parachin *et al.* 2012). Por esto, aún sigue siendo de interés el realizar estudios encaminados a la determinación de la abundancia y diversidad de las bacterias medioambientales resistentes a los antibióticos usando metodologías basadas en cultivo, de forma que, una



vez aisladas estas bacterias, se pueda proceder al análisis de su nivel de resistencia a múltiples antibióticos, y a la determinación de los elementos genéticos responsables de las resistencias y sus posibles mecanismos de diseminación. El conocimiento de los factores que pueden dirigir los procesos de selección y diseminación de los genes de resistencia a antibióticos en el medio ambiente aumentará considerablemente nuestra capacidad para su prevención en los ambientes clínicos, e igualmente nos podrá permitir determinar su efecto en la evolución de las poblaciones bacterianas en medios naturales.

En el trabajo que aquí se describe se ha llevado a cabo un estudio de la abundancia y la diversidad de bacterias resistentes a once antibióticos de uso común, así como de la resistencia múltiple a antibióticos de una parte de las bacterias aisladas, en concreto las resistentes a ampicilina, procedentes de dos sistemas acuáticos, uno salino y contaminado, como es la ría de Huelva (Olías *et al.* 2006, Nieto *et al.* 2007, Sarmiento *et al.* 2009, Pérez-López *et al.* 2011), y otro de agua dulce y cuasi prístino, como la Chorrera de Despeñalagua, en la provincia de Guadalajara.

## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue el estudio de la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos de uso común en dos sistemas acuáticos, uno contaminado y otro cuasi prístino, caracterizando algunas de dichas bacterias en cuanto a sus posible multirresistencia y a su diversidad filogenética.

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar la abundancia de bacterias cultivables resistentes a cada uno de los once antibióticos de uso común elegidos para este estudio, a partir de muestras de los ecosistemas acuáticos de la ría de Huelva (contaminado) y de la Chorrera de Despeñalagua (cuasi prístino) en dos medios de cultivo diferentes.
2. Aislar bacterias cultivables resistentes a ampicilina a partir de muestras de los ecosistemas acuáticos mencionados anteriormente.
3. Determinar la resistencia/susceptibilidad de los aislados resistentes a ampicilina a los otros diez antibióticos de uso común, definir los perfiles de multirresistencia y calcular el índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) de los aislados procedentes de los dos ecosistemas.
4. Identificar filogenéticamente aquellos aislados con perfiles de resistencia y características fenotípicas diferentes, mediante la secuenciación de los genes ARNr 16S y el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.
5. Realizar estudios estadísticos para determinar si existen correlaciones entre distintos parámetros de los grupos de aislados resistentes a ampicilina según su lugar de origen, la fase (líquida o sedimento), de la que proceden y los medios sobre los que fueron aislados.
6. Estudiar la prevalencia de la resistencia a ertapenem entre los aislados obtenidos y estudiados según los objetivos anteriores y determinar y analizar estadísticamente la concentración mínima inhibitoria de esta carbapenema para cada aislado.

### **3. *MATERIALES Y MÉTODOS***



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos utilizados y casa comercial de procedencia

**Tabla 3.** Reactivos utilizados y casas comerciales proveedoras.

Reactivos	Casa comercial
Acetato sódico	MERCK
Ácido acético	MERCK
Ácido clorhídrico	MERCK
Ácido nalidíxico	SIGMA
Acrilamida-bis-acrilamida (37,5:1)	BIORAD
Agar bacteriológico	LABS. CONDA
Agar marino	DIFCO
Agarosa	LABS. CONDA
Ampicilina	DUCHEFA
Bacto-peptona	LABS. CONDA
Bromuro de etidio	SIGMA
Cebadores	ISOGEN
Ceftazidima	SIGMA
Cicloheximida	DUCHEFA
Citifluor	EMS
Cloranfenicol	BOEHRINGER
Cloruro de magnesio (PCR)	APPLIED BIOSYSTEMS
Cloruro de potasio	MERCK
Cloruro de sodio	MERCK
DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)	SIGMA
dNTPs	INVITROGEN
Dodecil sulfato sódico (SDS)	MERCK
EDTA (Tritiplex III)	MERCK
Eritromicina	BOEHRINGER
Ertapenem	MERCK
Estreptomicina	DUCHEFA
Etol 96°	VWR Chemicals
Etol absoluto	MERCK
Extracto de carne	MERCK
Filtros GTTP 0,22 µm tamaño de poro	MILLIPORE
Fosfato disódico	SIGMA
Fosfato monopotásico	SIGMA
Glicerol 87%	MERCK
Hidróxido sódico	MERCK
Kanamicina	SIGMA
Lisozima	FLUKA
Metanol	MERCK
Polietilenglicol 6000	SIGMA
Proteinasa K	SIGMA
Rifampicina	DUCHEFA
Tampón PCR (10X)	APPLIED BIOSYSTEMS/NZTech
Taq-polimerasa/Tampón 10X	APPLIED BIOSYSTEMS/NZTech

Tetraciclina	SIGMA
Trimetoprima	DUCHEFA
Trizma base	SIGMA
Vancomicina	DUCHEFA
φ29-HindIII ADN	CBMSO

### 3.2. Descripción de las zonas de estudio

#### 3.2.1. Situación geográfica y características de la ría de Huelva

La ría de Huelva es un estuario que se encuentra al sur de la provincia de Huelva y se extiende entre las localidades de Huelva, Punta Umbría y Palos de la Frontera (España). Está formada por la confluencia de los ríos Odiel y Tinto, recibiendo además aporte de agua marina procedente del Océano Atlántico. Estas condiciones hacen que el ecosistema acuático de la ría de Huelva sea extremadamente heterogéneo y cambiante en sus parámetros (salinidad, temperatura, composición química, régimen estacional de mareas, etc.). Sin embargo, estas condiciones tan variables son especialmente interesantes por la gran diversidad de microorganismos que pudieran proliferar en esta zona a partir de los que le llegan: los microorganismos propios del medio marino, los procedentes de las aguas de los ríos Tinto y Odiel, y los de los vertidos de aguas residuales tratadas en la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Huelva.

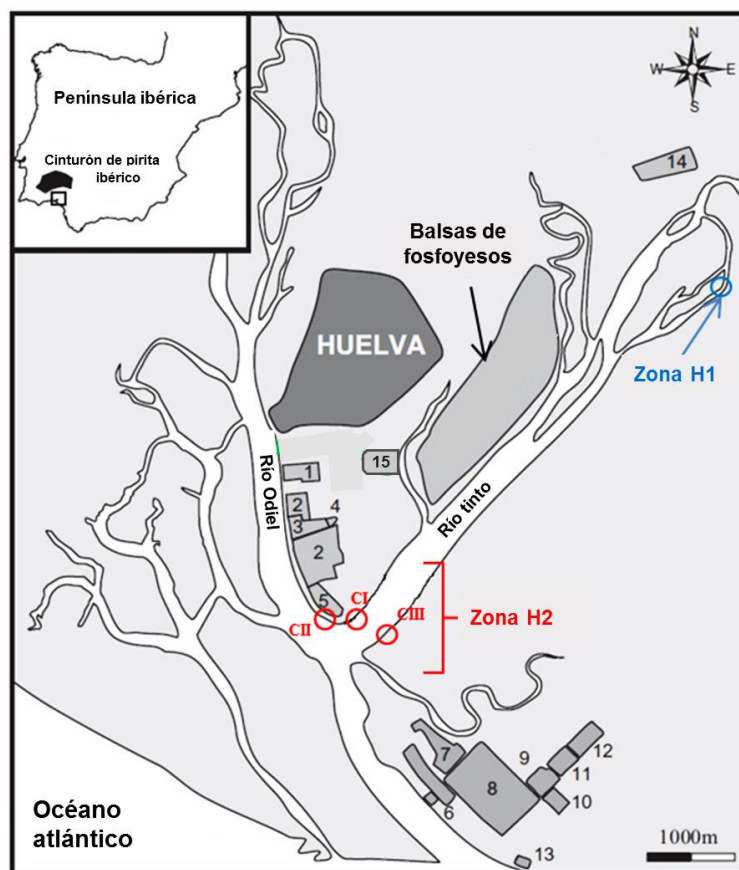
En las proximidades de la ría se encuentra también el Polo Químico de Promoción y Desarrollo de Huelva, un grupo de instalaciones químicas que constituye uno de los complejos industriales más importantes de España. Consta de 12 empresas incluyendo fábricas de fertilizantes, petroquímicas, mineras y centrales térmicas. Las actividades de estas empresas, sobre todo las de fertilizantes, generan una serie de residuos (principalmente fosfoyesos y pequeñas cantidades de uranio, polonio, radio, radón y plomo) que se almacenan en unas balsas cercanas a la población y al ecosistema acuático. Los flujos de residuos de las balsas hacia la ría por filtraciones o grietas en las mismas podrían constituir una fuente de contaminación de ésta (Pérez-López *et al.* 2011).

### **3.2.1.1. Zonas de muestreo**

Se eligieron dos puntos de muestreo (figura 6), uno situado aguas arriba de las balsas de fosfoyesos de la empresa de fertilizantes (Fertiberia), en las marismas del río Tinto, al que se le denominó **H1** (latitud: 37°16'57.81"N, longitud: 6°50'59.68"W) y otra zona aguas abajo de la empresa de fertilizantes que se designó como **H2**, zona en la que confluyen los ríos Tinto y Odiel y de la que se tomaron muestras en tres puntos para que fuese más representativa: **CI** (latitud: 37°12'48.92"N, longitud: 6°56'15.23"W), **CII** (latitud: 37°12'41.30"N, longitud: 6°56'27.21"W) y **CIII** (latitud: 37°12'41.51", longitud: 6°55'49.97"W).

En ambas zonas se tomaron muestras conteniendo agua y sedimento que se recogieron y almacenaron en botellas estériles de 500 mL y se conservaron a 4 °C hasta su uso. El muestreo se realizó el día 25/10/2011 entre las 10 y las 11 horas (h), con marea baja. De los distintos puntos de estudio se hicieron mediciones de parámetros fisicoquímicos utilizando una sonda multiparamétrica Thermo Orion 290A (Thermo Scientific, EE.UU.). Una vez en el laboratorio las muestras se dejaron decantar y se separaron la fase líquida y sedimento. Las muestras de los tres puntos de muestreo de la zona E se mezclaron en proporciones iguales (en volumen para las fases líquidas y por peso en las de sedimento) antes de su uso. Por lo tanto se obtuvieron 4 muestras distintas que se denominaron: **H1L** (zona H1, fase líquida), **H1S** (zona H1, sedimento), **H2L** (zona H2, fase líquida), **H2S** (zona H2, sedimento).

El análisis de la composición elemental de las muestras se realizó en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid mediante la técnica de fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF) para las muestras de sedimento y mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para las muestras líquidas.



**Figura 6.** Mapa de la ría de Huelva y el polígono industrial. Los círculos representan las distintas zonas de muestreo: azul zona H1, rojo zona H2. 1 y 2-fábricas de fertilizantes, 3-industria metalúrgica, 4-planta de fabricación de gases, 5-central energética, 6-planta química, 7-almacén de hidrocarburos, 8 y 9-petroquímicas, 10-fábrica de fertilizantes, 11-planta química, 12-fábrica de pigmentos, 13-almacén de hidrocarburos, 14-fábrica de celulosa, 15-E.D.A.R. (Modificado de Pérez-López *et al.* 2011).

### 3.2.2. Situación geográfica y características de la Chorrera de Despeñalagua

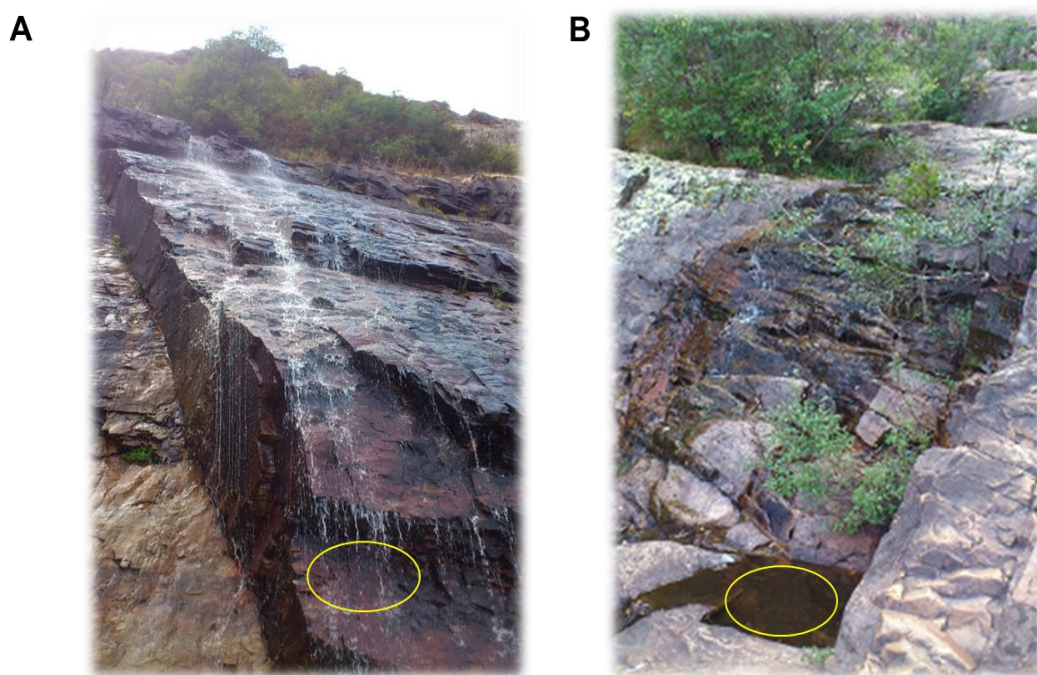
La Chorrera de Despeñalagua está constituida por una serie de cascadas consecutivas formadas en el cauce del arroyo de la Chorrera, afluente del río Sorbe, en la falda norte del pico Ocejón, cerca de Valverde de los Arroyos (Guadalajara, España), un pequeño municipio de 45 km<sup>2</sup> y 99 habitantes (Instituto Nacional de Estadísticas 2014). Todo el salto de agua tiene una altura de unos 120 m. La cascada se hiela durante el invierno y en la época de deshielo es cuando posee un mayor caudal. Estas cascadas constituyen un ecosistema natural aparentemente poco alterado por la acción humana, de ahí nuestro interés por llevar a cabo un análisis de la multirresistencia de bacterias a antibióticos empleando muestras de este ambiente como ejemplo de un ecosistema cuasi prístino y no contaminado.



### **3.2.2.1. Zonas de muestreo**

En la cascada se establecieron dos puntos de muestreo, uno situado a 1376 m de altitud denominado **G1** (latitud 41°07'35,6"N, y longitud 3°15'16,9"W) y otro a 1365 m de altitud que se designó como **G2** (latitud 41°07'27,04"N, y longitud 3°15'16,55"W). En el primer punto de muestreo se recogió el agua de la chorrera según caía antes de que llegase al suelo, para tener una muestra lo menos alterada posible. El punto de muestreo G2 corresponde a una pequeña charca formada por la acumulación de agua caída de la chorrera, pero que sigue teniendo un flujo de salida de ésta (figura 7). Este último punto de muestreo se escogió debido a que podría haber sufrido una mayor alteración o contaminación al haber transcurrido el agua que contiene por una zona de suelo más accesible a la acción humana. No se tomaron muestras de sedimento al ser la muestra G1 directamente tomada del agua de la cascada y prácticamente no existir sedimento en el caso de la zona de muestreo G2.

Las muestras se recogieron y almacenaron en botellas estériles de 500 mL y se conservaron a 4 °C hasta su uso. El muestreo se realizó el día 30/08/2013 entre las 16 y las 17 h. De los dos puntos de muestreo se hicieron mediciones de pH y temperatura con una sonda multiparamétrica Thermo Orion 290A (Thermo Scientific, EE.UU.). El análisis semicuantitativo de la composición elemental de las muestras se realizó en el SIdI de la Universidad Autónoma de Madrid mediante ICP-MS.



**Figura 7.** Zonas de muestreo en la Chorrera de Despeñalagua. Los círculos amarillos representan los puntos de muestreo. **A:** G1 y **B:** G2

### **3.3. Determinación de la abundancia de bacterias totales y cultivables resistentes a diferentes antibióticos**

#### **3.3.1. Bacterias totales**

Las muestras líquidas se fijaron *in situ* en formaldehído al 4% durante 12h a 4°C y se filtraron a través de membranas GTTP de tamaño de poro 0,22  $\mu\text{m}$ , que fueron luego lavadas con tampón fosfato PBS (1X: 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4). A continuación, se dejaron secar a temperatura ambiente antes de la tinción. Tras ese tiempo, a un fragmento de la membrana se agregó una solución 1  $\mu\text{g/mL}$  de DAPI sobre la superficie y de manera homogénea, incubándose durante 5 min y eliminándose posteriormente el exceso de DAPI mediante un lavado con agua milliQ por 1 min y luego otro con etanol al 70% (v/v) por el mismo período de tiempo. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente y en oscuridad durante otros 20 min antes de ser usada para el recuento. A continuación se montó con Citifluor para su observación al microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axiovert 200) utilizando el filtro óptico correspondiente y un objetivo de 100X. Se leyeron 12 campos aleatorios por filtro. Debido a las dificultades para el recuento de las bacterias totales en las

muestras de sedimento mediante esta metodología, éstas no fueron determinadas.

### **3.3.2. Bacterias cultivables y resistentes a antibióticos**

Se sembraron por triplicado y en condiciones de esterilidad distintos volúmenes de cada muestra, o diluciones de las mismas, extendiéndola con una espátula de Drigalsky de vidrio en cada placa Petri de 9 cm de diámetro (Thermo Scientific, EE.UU.) conteniendo medio marino comercial o nutritivo (3 g/L extracto de carne, 5 g/L NaCl, 10 g/L bactopectona, 15 g/L agar bacteriológico) suplementado con cada uno de los 11 antibióticos, y con cicloheximida para evitar el crecimiento de hongos, a las concentraciones que se muestran en la tabla 4. Estos 11 antibióticos fueron elegidos por ser de uso común y tener diversos mecanismos o dianas de actuación. También se sembraron placas de medio sin selección tanto de marino como de nutritivo suplementados solo con cicloheximida para determinar las bacterias cultivables totales. En el caso de los sedimentos procedentes de las zonas de muestreo de la ría de Huelva, las muestras utilizadas para estos recuentos fueron suspensiones de sedimento conteniendo 8 g del sedimento de la muestra H1S o 20 g de H2S llevados hasta 15 mL y 50 mL finales respectivamente con el medio de cultivo líquido (marino o nutritivo) correspondiente.

Una vez sembradas las placas se incubaron a 30°C durante 5 días. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron aquellas de cada muestra que tenían un número de colonias alrededor de 200 para realizar el recuento. La abundancia relativa se expresó como porcentaje de bacterias resistentes a cada antibiótico con respecto al total de cultivables determinadas en medio sin selección.

### **3.4. Aislamiento y conservación de bacterias resistentes a ampicilina**

En vista de la alta abundancia y diversidad fenotípica de las colonias que se obtuvieron se decidió realizar el estudio de multirresistencia solo para las bacterias resistentes al antibiótico betalactámico ampicilina (*Ap*). Para ello

se procedió al aislamiento de estas bacterias por métodos de Microbiología clásica.

A partir de los datos de abundancia determinados para las distintas muestras, se realizaron las diluciones apropiadas para tener un número adecuado de bacterias por placa y se sembraron en 5 placas de Petri por muestra conteniendo medios marino o nutritivo suplementados con ampicilina y cicloheximida. Las placas se incubaron a 30°C durante 5 días.

Aquellas colonias con características fenotípicas diferenciadas fueron aisladas por pases sucesivos en medio sólido conteniendo los mismos agentes selectivos. Cuando el número de colonias de aspecto similar fue superior a tres se tomó una de cada tres colonias para su aislamiento. Tras los pases necesarios para obtener colonias bien separadas y de aspecto homogéneo se procedió a su conservación a 4°C, para detener su crecimiento hasta terminar la fase de aislamiento. Posteriormente, cada uno de los aislados fue conservado en una mezcla de medio de cultivo:glicerol 87% (50:50 v/v) por duplicado. Se utilizaron placas multipocillo (96 pocillos), manteniendo una de las copias a -75°C y la otra a -20°C.

### **3.5. Determinación de la multirresistencia de los aislados y cálculo del índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR)**

#### **3.5.1. Determinación de la multirresistencia**

Con cada uno de los aislados resistentes a ampicilina se llevaron a cabo ensayos de resistencia a los restantes diez antibióticos utilizados en este estudio (tabla 4).

Las concentraciones de antibióticos empleadas fueron elegidas en base a los valores considerados como límites entre susceptibilidad y resistencia (breakpoints) por varias organizaciones internacionales como el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), el *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (SFM), la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC), la *Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos* (MENSURA) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility*

*Testing* (EUCAST) (Leclercq *et al.* 2013). Los valores empleados por nosotros fueron generalmente algo superiores a los descritos. Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ertapenem para los distintos aislados, se utilizaron concentraciones en un rango elegido (tabla 4) según los datos de estudios previos de resistencia con aislados clínicos descritos en la literatura (Fuchs *et al.* 1999, Gobernado *et al.* 2007a, MENSURA 2000, EUCAST 2009, 2013).

**Tabla 4.** Antibióticos empleados y concentraciones de los mismos utilizadas en los experimentos realizados. Abr.: abreviatura, Conc.: concentración, Disol.: disolvente.

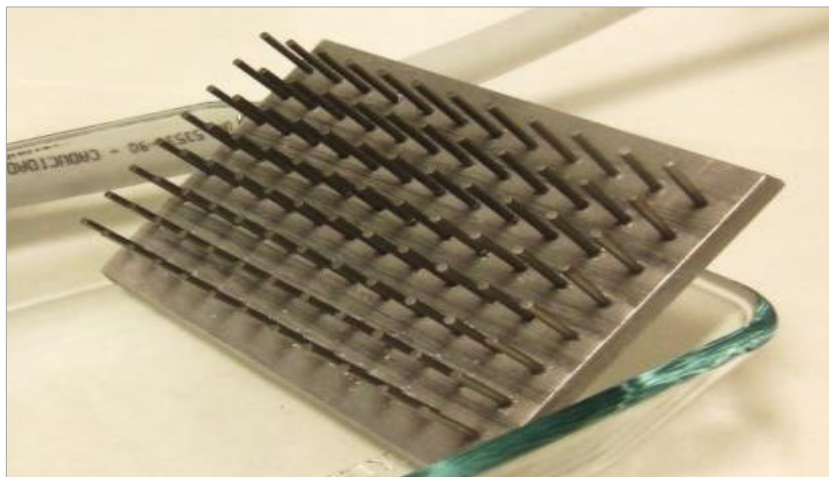
Antibiótico	Abr.	Conc. (µg/ml)	Familia	Disol.
Ampicilina	Ap	50	Betalactámicos	H <sub>2</sub> O
Kanamicina	Km	50	Aminoglicósidos	H <sub>2</sub> O
Ac. Nalidíxico	Nx	50	Quinolonas	NaOH
Estreptomicina	Sm	100	Aminoglicósidos	H <sub>2</sub> O
Ceftazidima	Cz	50	Betalactámicos	H <sub>2</sub> O
Vancomicina	Vm	50	Glicopéptidos	H <sub>2</sub> O
Tetraciclina	Tc	25	Tetraciclinas	Metanol
Cloranfenicol	Cc	25	Fenicoles	Metanol
Eritromicina	Em	25	Macrólidos	Metanol
Trimetoprima	Tm	16	Antifólicos	Metanol
Rifampicina	Rp	8	Ansamycinas	Metanol
Cicloheximida	Ch	75	Derivados de cicloalcanos	Metanol
Ertapenem	Ep	0,063	Betalactámicos	H <sub>2</sub> O
		0,125		
		0,25		
		0,50		
		1		
		2		
		4		
		8		

Para los ensayos de determinación de la resistencia de los aislados, se emplearon placas cuadradas de 12x12 cm (Daslab, España) con agar nutritivo o marino, dependiendo del medio en que cada aislado había sido obtenido, suplementados individualmente con cada uno de los once antibióticos a las concentraciones indicadas en la tabla 4. Igualmente, se inocularon placas con agar nutritivo o marino sin antibióticos como controles de crecimiento sin selección.

Para inocular las placas se utilizó una pieza metálica con 96 pinchos (figura 8) dispuestos para encajar en las placas de microtítulo en las que se

conservaban los aislados a -20°C. Este utensilio se impregnó en etanol de 96° y se flameó para esterilizarlo antes de su uso. Una vez sembradas las placas, se incubaron durante 5 días a 30°C antes de proceder a observar y anotar en una base de datos, con ayuda del software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, EE.UU.), las bacterias que habían crecido en cada placa, estableciendo así el perfil de resistencia de cada aislado.

En base a los datos obtenidos se eligieron para su identificación, de los procedentes de cada muestra original, aquellos aislados que mostraban perfiles de resistencia diferentes, y entre los que compartían el mismo perfil, todos los que mostraban colonias con distintas características fenotípicas.



**Figura 8.** Pieza metálica de 96 pinchos utilizada en la determinación de la multiresistencia.

### **3.5.2. Cálculo de los índices de resistencia múltiple a antibióticos (MAR)**

Se determinaron los valores de MAR para cada aislado como el  $\frac{0}{1}$  del número de antibióticos a los que fue resistente de los once usados (Paul *et al.* 1997)). Para grupos concretos de aislados se determinaron los valores de media aritmética, mediana y moda utilizando Microsoft Excel 14.1.0.

### **3.6. Asignación filogenética**

La asignación filogenética de todos los aislados seleccionados se llevó a cabo en base a la similitud de las secuencias de sus genes de ARNr 16S con las existentes en el GenBank. La asignación a nivel de especie de los aislados del género *Pseudomonas* mediante el análisis de la secuencia

de sus ARNr 16S resultó infructuosa en algunos casos, empleándose entonces la secuencia del gen *rpoD* que ha sido propuesto como útil para este propósito (Mulet *et al.* 2009, Sánchez *et al.* 2014). No obstante algunos aislados no pudieron ser completamente identificados a nivel de especie.

Para la asignación filogenética se procedió según se indica a continuación:

### **3.6.1. Extracción de ADN bacteriano**

Para cada aislado, una colonia se resuspendió en un vial con 10 µL de solución de lisis (proteínasa K 400 ng/µL, SDS 0,005%), procediéndose según previamente descrito (Kai *et al.* 2006) para la lisis de las células.

Alternativamente, cuando el método de la solución de lisis no dio resultado, se empleó el Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc, EE.UU.) para obtener el ADN a partir de cultivos en medio líquido. Para ello, una colonia del aislado fue inoculada en 5 mL del medio líquido correspondiente e incubada a 30°C. Las células fueron sedimentadas y tratadas según las instrucciones del fabricante del kit, salvo por una modificación introducida en el protocolo consistente en un tratamiento previo de las células con lisozima 10 mg/mL durante 1 h a 37°C, con el fin de facilitar la lisis de las células de los aislados más recalcitrantes.

### **3.6.2. Amplificación por PCR de las secuencias de los genes de ARNr 16S y *rpoD***

El ADN extraído según se indica en el apartado anterior se utilizó para la amplificación mediante PCR de los genes del ARNr 16S y *rpoD*. Para aquellas muestras de ADN procedentes de solución de lisis fue preciso en algunos casos realizar una dilución previa de la preparación para obtener un resultado positivo en la PCR. Se probaron distintas diluciones determinándose que en la mayor parte de los casos una dilución 1/5 era la más adecuada.

Los cebadores utilizados fueron los que se especifican en la tabla 5. Los cebadores 27F y 1492R se utilizaron para la amplificación del gen casi

completo del ARNr 16S y PsEG30F y PsEG790R para la amplificación del gen *rpoD* de los miembros del género *Pseudomonas*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems, EE UU). Las mezclas de reacción contenían, en 50 µL finales, además del ADN molde: tampón de PCR (1X), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0,25 µM (c/u), cebadores 0,50 µM (c/u), Taq polimerasa 2,5 U.

Las condiciones de temperatura y tiempo de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, así como los ciclos correspondientes a cada una de las parejas de cebadores utilizados se muestran en la tabla 5. Para todas las reacciones se utilizó un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

**Tabla 5.** Cebadores usados en las PCRs y condiciones de éstas. Desn.: fase de desnaturalización, Hibr.: fase de hibridación, Ext.: fase de extensión, N° Cicl.: número de ciclos.

Genes	Cebadores* (5'-3')		Desn.	Hibr.	Ext.	N° Cicl.
ARNr 16S	<b>27F:</b> AGAGTTTGATC(M)TGGCTCAG <b>1492R:</b> TACGG(Y)TACCTTGTTACGACTT	Lane 1991	94 °C 1'	54 °C 1'	72 °C 1,5'	30
<i>rpoD</i>	<b>PsEG30F:</b> ATYGAAATCGCCAARCG <b>PsEG790R:</b> CGGTTGATKTCCTTGA	Mulet <i>et al.</i> 2009	94°C 1'	52°C 1'	72 °C 1,5'	30
*Código de degeneración de nucleótidos según IUPAC: M=A,C, N=A,C,G,T, Y=T,C , K=G,T						

Los amplicones obtenidos mediante PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8). Para visualizar el ADN en los geles, éstos se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 µg/mL. Las bandas de ADN se visualizaron y se fotografiaron en un documentador de geles (Uvitec, Reino Unido).

### 3.6.3. Secuenciación y análisis de las secuencias

Los amplicones obtenidos en las PCRs se purificaron, para su posterior secuenciación, mediante precipitación del ADN con una solución



conteniendo 20% polietilenglicol 6000 y 2,5 M NaCl, siguiendo un protocolo descrito previamente (Sambrook *et al.*, 1989). Para determinar la concentración de ADN purificado se empleó un espectrofotómetro Thermo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, EE.UU.).

La secuenciación fue llevada a cabo por la compañía Macrogen (Holanda), utilizando las concentraciones de molde y cebadores recomendados por la casa comercial. Para ello, tras la purificación de los amplicones se determinaron las concentraciones de las muestras de ADN purificado ajustándolas a los valores requeridos por dilución, o en su caso por concentración al vacío en un SpeedVac Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Alemania). Las muestras de ADN fueron colocadas en placas multipocillo junto con el cebador necesario y fueron enviadas para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas manualmente visualizando el electroforegrama mediante el programa Finch TV ([www.geospiza.com](http://www.geospiza.com)). Para determinar la similitud de las secuencias obtenidas con las presentes en la base de datos GenBank se empleó el algoritmo BLASTn en la correspondiente página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de los EEUU (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los resultados nos permitieron asignar los aislados según su género y en algunos casos según su especie (identidad  $\geq 97\%$ ). Las secuencias de algunos aislados dieron porcentajes de similitud del 100% para secuencias asignadas a diferentes especies, por lo que no fue posible hacer una asignación precisa a nivel de especie y fueron recogidos en las tablas de asignación en la sección de resultados con la expresión “sp.” siguiendo al nombre del género. Este fue el caso para muchos de los aislados del género *Pseudomonas* obtenidos a partir de las muestras de la Chorrera de Despeñalagua, para los cuales se intentó una adscripción más específica mediante el análisis de la secuencia del gen *rpoD*, utilizando la misma metodología descrita anteriormente para los genes de ARNr 16S.

### **3.7. Análisis estadísticos**

#### **3.7.1. Resultados de la multirresistencia**

Una vez obtenidos los datos de multirresistencia, se utilizaron diferentes técnicas estadísticas, que se indican a continuación, para analizar los resultados. El software empleado para los análisis fue el Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 21.0 (IBM Corporation, EE UU).

La estadística descriptiva se realizó mediante un conjunto de técnicas que facilitaron la organización, resumen y comunicación de datos como por ejemplo las medidas de la tendencia central (media, mediana, moda y suma) y la distribución (asimetría) usando el software Microsoft excel y SPSS.

Antes de realizar las pruebas estadísticas más complejas, se procedió a la evaluación de la distribución de las variables. Esto se realizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, una prueba no paramétrica que determina la bondad del ajuste para comprobar si se verifica la hipótesis de normalidad necesaria para que el resultado de algunos análisis sea fiable, lo cual condiciona las pruebas que se pueden realizar posteriormente.

Para comparar las medidas de tendencia central (media o mediana) de resistencia a antibióticos de cada aislado entre las zonas de muestreo (Guadalajara: G1 y G2; Huelva: H1L, H2L, H1S y H2S) o el medio (marino/nutritivo) en el que fueron aisladas cada una de las bacterias, considerando la muestras totales, se realizaron pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney para el caso de variables cualitativas de dos categorías y Kruskal-Wallis, para variables que tengan más de dos categorías, ya que nuestras variables no seguían una distribución normal.

Para comprobar si el hecho de que los aislados perteneciesen a una zona de muestreo u otra, o hubiesen sido obtenidos sobre un medio de cultivo u otro, tenía alguna asociación estadística con la resistencia de los aislados a cada uno de los antibióticos (resistente/sensible), se emplearon tablas de contingencia y pruebas de contraste de Chi-cuadrado al tratarse de asociación entre variables cualitativas.

### 3.7.2. Coexistencia de las resistencias a dos antibióticos

Se determinó la existencia o no de una concordancia lineal directa o inversa entre la resistencia de los aislados a dos antibióticos diferentes simultáneamente, mediante el cálculo del índice Kappa ( $K$ ). A diferencia de las pruebas anteriores, en este análisis se consideraron tanto las muestras totales como los géneros identificados por separado.

Para la interpretación de los resultados del valor de  $K$  se utilizó la escala (tabla 6) propuesta por Altmann (Altmann 1991).

**Tabla 6.** Escala de valoración del índice de Kappa.

Fuerza de la concordancia	Valor de K
Pobre o nula	<0,20
Débil	0,21 – 0,40
Moderada	0,41 – 0,60
Buena	0,61 – 0,80
Muy buena	0,81 – 1,00

El grado de significación estadística ( $p$ ) es el parámetro que cuantifica el error que estamos cometiendo al aceptar nuestros resultados. Su valor oscila entre 0 y 1. En general, se ha fijado por convenio el umbral de 0,05 como válido, es decir, nos permitimos un error máximo de 5 % en nuestra afirmación en todas las pruebas estadísticas realizadas en este estudio o que representa una seguridad del 95% que la asociación que estamos estudiando no sea por el azar.

### 3.7.3. Cálculo de índices de biodiversidad

Se utilizaron los índices de Margalef ( $D_{Mg}$ ), de Simpson ( $\lambda$ ) y de Shannon-Wiener ( $H'$ ), determinados a partir de las asignaciones específicas obtenidas según se indica en el apartado 3.6.3. de esta misma sección. El significado de estos índices y sus cálculos se indican a continuación.

#### 3.7.3.1. Índice de Margalef

Este índice de riqueza específica estima la biodiversidad de una comunidad con base en la distribución numérica de los individuos de las diferentes especies en función del número de individuos existentes en la muestra analizada y se calcula como:

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln(N)}$$

donde **S** es el número de especies y **N**, el número total de individuos de todas las especies.

Valores inferiores a 2 son considerados como zonas de baja biodiversidad y valores superiores a 5 son indicativos de alta biodiversidad (Moreno 2001).

### **3.7.3.2. Índice de Simpson**

Este índice de dominancia manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie, y se calcula como:

$$\lambda = \sum p_i^2$$

donde **pi** es la abundancia proporcional de la especie **i**, es decir, el número de individuos de la especie **i** dividido entre el número total de individuos de la muestra.

Está fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes (Magurran 1988). Como su valor es inverso a la equidad, la diversidad puede calcularse como:  $1/\lambda$  (Lande 1996). Por tanto, la diversidad aumenta con el incremento del valor de  $\lambda$  con un máximo de 1 (Moreno 2001).

### **3.7.3.3. Índice de Shannon-Wiener**

Es un índice de abundancia proporcional que en un contexto ecológico, relaciona el contenido de información por individuo en muestras obtenidas al azar provenientes de una comunidad “extensa” de la que se conoce el número total de especies. También puede considerarse como una medida de la incertidumbre para predecir a qué especie pertenecerá un individuo elegido al azar de una muestra de **ni** especies y **N** individuos (Magurran 1988). Su expresión es:

$$H' = - \sum p_i \times \ln(p_i)$$

donde  $p_i$  ( $n_i/N$ ) es la abundancia proporcional de una especie  $i$ ,  $n_i$  es el número de individuos de la especie y  $N$ , el número total de individuos de todas las especies.

Por tanto,  $H' = 0$  cuando la muestra contenga una sola especie, y  $H'$  será máxima cuando todas las especies  $n_i$  estén representadas por el mismo número de individuos, es decir, que la comunidad tenga una distribución de abundancias perfectamente equitativa. Valores por encima de 3 son típicamente interpretados como “diversos”. Este índice subestima la diversidad específica si el tamaño de la muestra es pequeña (Moreno 2001).

## **4. *RESULTADOS***



## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Caracterización de las muestras de la ría de Huelva**

#### **4.1.1. Parámetros fisicoquímicos**

Los parámetros fisicoquímicos mostraron pocas variaciones en el pH (H1L: 6,2 y H2L: 6,4) y en la temperatura (H1L: 17,5 °C y H2L: 19,6 °C) y, unos valores algo más diferenciados en salinidad (H1L: 27,1 ‰ y H2L: 31,6 ‰), conductividad (H1L: 42,1 mS/cm y H2L: 48,3 mS/cm) y potencial redox (H1L: 159,0 mV y H2L: 189,7 mV).

Los resultados del análisis elemental semicuantitativo de las muestras de agua (tabla 7) indican que los elementos con mayor concentración en las muestras H1L y H2L fueron: B, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Rb, Sr y V. También se observó que, por lo general, había unas concentraciones mayores de Be, Cr, Cu, Fe, Mn, y Ni en la muestra H1L y unas concentraciones inferiores de B, Ca, K, Li, Mg, Na, Rb, Sr y V en relación a la muestra H2L. Las concentraciones de los demás elementos no variaron significativamente entre las dos muestras.

El resultado del análisis elemental de las muestras de sedimento mediante TXRF (tabla 8) muestra una mayor concentración de Cl, Cu, Fe, P y S y una menor concentración de Al, As y Ca en la muestra de la zona H1 (H1S) que en la de la zona H2 (H2S).

#### **4.1.2. Abundancia de bacterias totales y cultivables**

Las células totales en las muestras líquidas se cuantificaron mediante recuento de las mismas según se describe en la sección de materiales y métodos. El total de bacterias observadas en la muestra H1L fue de  $3,6 \times 10^7$  cél/mL y en la muestra H2L de  $2,9 \times 10^7$  cél/mL.

**Tabla 7.** Análisis elemental semicuantitativo de las muestras H1L y H2L.

	H1L (µg/L)	H2L (µg/L)
<b>Au</b>	3,937	4,244
<b>B</b>	5232,657	6198,895
<b>Ba</b>	30,902	30,044
<b>Be</b>	10,352	0,000
<b>Bi</b>	5,413	5,716
<b>Ca</b>	452126,471	504920,043
<b>Co</b>	0,388	1,166
<b>Cr</b>	58,991	29,533
<b>Cu</b>	74,217	20,915
<b>Fe</b>	5974,174	1686,919
<b>K</b>	332200,167	392848,888
<b>Li</b>	97,76	212,741
<b>Lu</b>	0,000	0,008
<b>Mg</b>	1171845,678	1419220,207
<b>Mn</b>	91,311	73,262
<b>Na</b>	8989404,573	10858108,925
<b>Ni</b>	29,209	13,157
<b>Pb</b>	7,996	8,773
<b>Rb</b>	7,434	125,975
<b>Sr</b>	6369,679	7600,336
<b>Te</b>	0,000	0,000
<b>Th</b>	28,453	26,707
<b>U</b>	35,188	38,250
<b>V</b>	121,695	145,059
<b>W</b>	0,000	0,000
<b>Y</b>	0,277	0,191

**Tabla 8.** Análisis elemental cuantitativo de las muestras H1S y H2S.

	H1S(mg/g)	H2S(mg/g)
<b>Al</b>	No detectado	8,522±0.781
<b>As</b>	0,602±0.003	1,135±0.005
<b>Ca</b>	5,690±0.036	11,560±0.058
<b>Cl</b>	122,053±0.270	67,507±0.249
<b>Cu</b>	2,180±0.071	0,485±0.004
<b>Fe</b>	59,328±0.050	38,607±0.049
<b>Mn</b>	0,138±0,006	0,197±0.007
<b>P</b>	8,786±0.227	4,141±0.220
<b>S</b>	4,929±0.107	1,634±0.107
<b>Ti</b>	0,998±0.013	0,842±0.014
<b>Zn</b>	1,256±0.005	1,411±0.006

Para determinar la abundancia de bacterias cultivables presentes en las muestras, se realizaron recuentos de bacterias en medios de cultivo sólidos nutritivo y marino y los valores obtenidos fueron expresados como porcentajes de cultivables con respecto a las bacterias totales existentes en las muestras, que habían sido determinadas previamente según se indica en el apartado anterior. El porcentaje de bacterias cultivables en la muestra H1L en medio marino (H1L-M) fue del 3,0%, considerablemente superior al

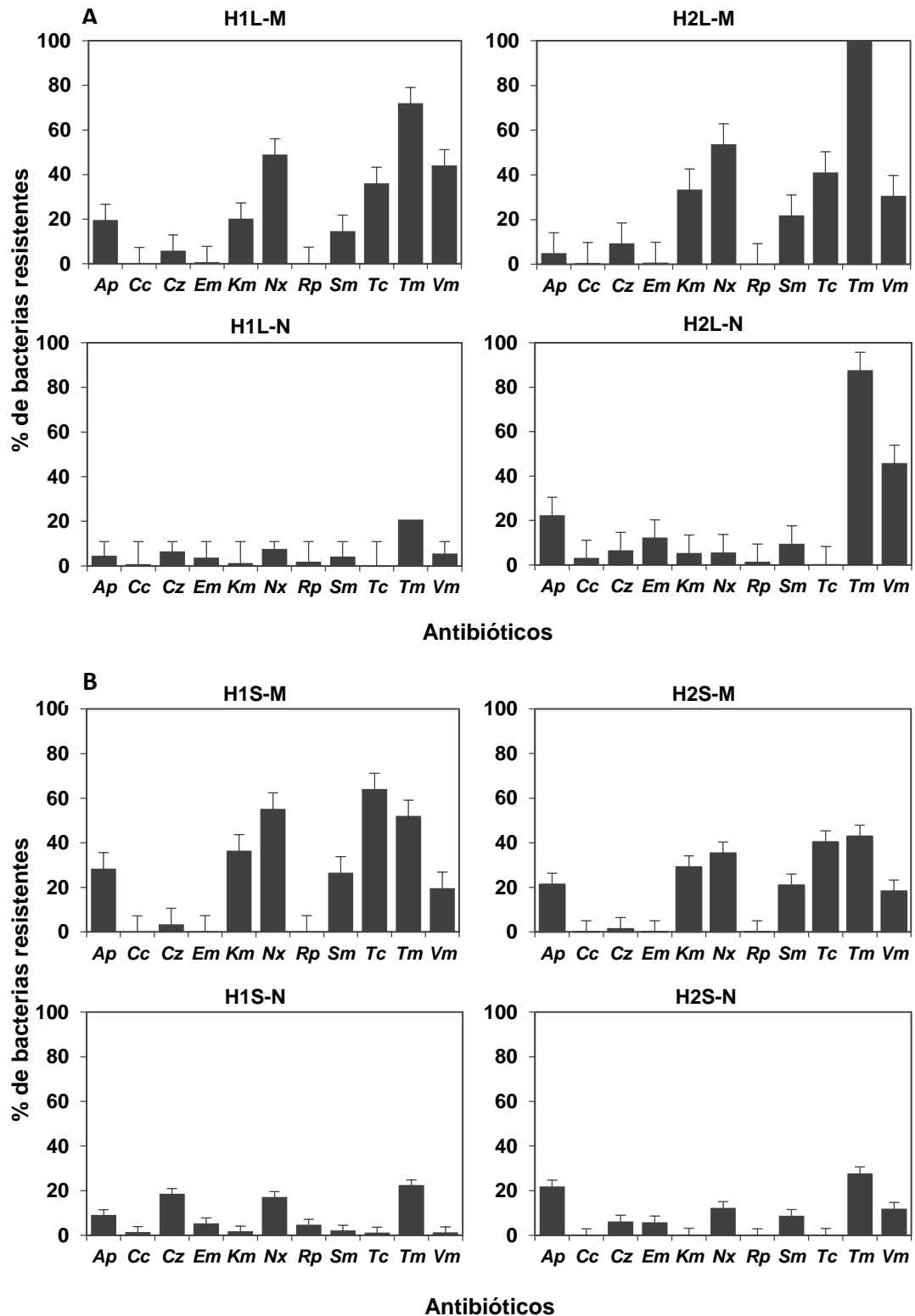


observado en medio nutritivo (H1L-N) con un 0,14%. Esta diferencia fue similar en la zona de muestreo H2 representando un 0,23% y un 0,01% para las cultivables en medio marino (H2L-M) y nutritivo (H2L-N) respectivamente. De esta forma, se detectó una mayor abundancia de bacterias cultivables en medio marino que en nutritivo en ambas muestras y además se observó que para ambos medios existe una abundancia relativa notablemente mayor de bacterias cultivables en la muestra H1L que en la H2L.

Por la dificultad de determinar las bacterias totales presentes en las muestras de sedimento, las bacterias cultivables en esta fase de cada muestra se determinaron como unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL) de la suspensión de sedimento utilizada, obteniéndose valores de  $2,5 \times 10^7$  para H1S-M (equivalente a  $4,7 \times 10^7$  ufc/g), superior al encontrado en la muestra H1S-N con un valor de  $5,1 \times 10^5$  (equivalente a  $9,6 \times 10^5$  ufc/g). En la zona de muestreo H2 fue superior esta diferencia siendo de  $1,2 \times 10^7$  (equivalente a  $3,0 \times 10^7$  ufc/g) para H2S-M y  $4,2 \times 10^4$  (equivalente a  $1,05 \times 10^5$  ufc/g) para H2S-N.

#### **4.1.3. Abundancia de bacterias resistentes a los antibióticos**

La abundancia relativa de bacterias resistentes a los distintos antibióticos utilizados en este estudio se determinó como se indica en la sección de materiales y métodos y se expresó como porcentaje del total de las bacterias cultivables (figura 9). Como se puede observar, existen unos porcentajes de bacterias resistentes a la mayoría de los antibióticos ensayados en el medio marino más elevados que los observados sobre medio nutritivo. La mayor diferencia entre los porcentajes de resistentes en uno u otro medio se observó para *Tc*. Al contrario ocurre con los antibióticos *Cc*, *Em* y *Rp*, para los que esta diferencia es ligeramente superior en favor de las bacterias cultivadas en medio nutritivo. Hay que resaltar la detección de porcentajes elevados de bacterias resistentes a *Tm* en ambas zonas de muestreo, así como en los dos medios de cultivo utilizados.



**Figura 9.** Abundancia relativa de bacterias cultivables resistentes a distintos antibióticos. **A:** fases líquidas y **B:** fases sedimento. M: medio marino, N: medio nutritivo.

Comparando los porcentajes de resistentes a los diferentes antibióticos en las fases líquida y de sedimento para cada zona de muestreo (figura 9), se observan valores generalmente más altos sobre medio marino

que sobre nutritivo independientemente de la muestra y la fase. En la zona de muestreo H2 se detectaron porcentajes generalmente mayores para los distintos antibióticos en la fase líquida que en el sedimento y en ambos medios de cultivo, pero no así con las muestras de la zona de muestreo H1 para la que los porcentajes fueron por lo general similares en la fase líquida y en el sedimento si se consideran los analizados sobre medio marino y sin una tendencia clara en el caso de los analizados sobre medio nutritivo.

#### **4.1.4. Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a ampicilina**

En vista de las elevadas abundancias de bacterias resistentes a los antibióticos observadas y las limitaciones de tiempo disponible para el aislamiento y la caracterización de todas ellas se decidió estudiar solo aquellas resistentes a ampicilina. Se eligió este antibiótico por ser de una familia de antibacterianos, los betalactámicos, a la que pertenecen un gran número de los antibióticos más comúnmente utilizados en clínica.

##### **4.1.4.1. Aislamiento de las bacterias**

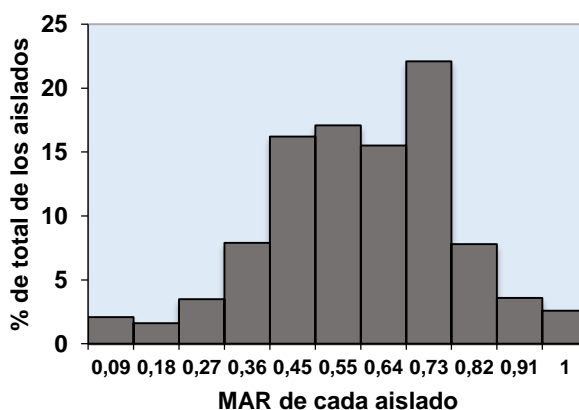
Las bacterias se aislaron mediante pases sucesivos sobre los medios de cultivo sólidos nutritivo o marino con Ap. Se aislaron un total de 579 bacterias distribuidas entre las distintas muestras y sobre los dos medios. El 50,6% de estas bacterias proceden de la zona de muestreo H2, un 63,8% de las cuales procedieron de la fase líquida (H2L). El 49,4% restante de los aislados procedían de la zona de muestreo H1, y de éstos un 63,6% de la fase líquida (H1L). Considerando ambas zonas de muestreo, el mayor número de bacterias fueron aisladas sobre el medio marino (72,4%). Los porcentajes de aislados sobre medio marino fueron ligeramente diferentes para las dos zonas de muestreo 74,1% de los procedentes de la zona H2 y 70,6% de los de la zona H1.

##### **4.1.4.2. Distribución de los aislados según sus índices MAR y perfiles de multirresistencia**

Para determinar los perfiles de multirresistencia se observó el crecimiento de los aislados sobre medios suplementados con los

antibióticos correspondientes, tal como se indica en la sección de materiales y métodos.

Los recuentos realizados mostraron que un 1,6% de los aislados era resistente a un solo antibiótico, adicional a la *Ap*, mientras que los aislados resistentes a todos los antibióticos empleados constituyeron un 2,6%. Al representar el porcentaje de todos los aislados en conjunto según sus MARs (figura 10) se observa una distribución asimétrica ligeramente negativa (coeficiente de asimetría de Fisher  $g = -0,3$ ) de los valores de MAR, es decir, que existen porcentajes mayores de aislados con valores de MAR por debajo de la mediana de la distribución, cuyo valor es 0,636 (media 0,593).



**Figura 10.** Porcentajes de aislados según sus índices MAR.

Se han calculado los parámetros estadísticos mediana, media aritmética, y moda de los MAR de los aislados, así como el porcentaje de aislados con valor de MAR superior a 0,5, es decir de aquellos que son resistentes a más del 50% (al menos a 6 de los 11) de los antibióticos usados, (tabla 9). Se han considerado todos los aislados conjuntamente o independientemente según zonas de muestreo (H1 y H2), los medios de aislamiento (HM y HN) y las dos fases de cada zona de muestreo (H1L, H1S, H2L y H2S), diferenciando también para cada uno de estos grupos los aislados obtenidos sobre uno u otro medio (H1-M, H1-N, H2-M, H2-N, H1L-M, H1L-N, H2L-M, H2L-N, H1S-M, H1S-N, H2S-M, y H2S-N).

**Tabla 9.** Valores estadísticos de la distribución de los índices MAR de los aislados según su procedencia. Zonas de muestreo: H2 y H1, L: fase líquida, S: sedimento M: medio marino, N: medio nutritivo, HT: conjunto de todos los aislados de la ría de Huelva, HL todos los aislados de las fase líquida, HS todos los de la fase sedimento.

	Mediana	Media	Moda	% MAR>0,5	N
HT	0,636	0,592	0,727	68,7	579
HM	0,545	0,574	0,455	65,2	419
HN	0,727	0,640	0,727	78,1	160
H1	0,636	0,633	0,545	73,1	286
H2	0,636	0,583	0,727	64,5	293
HL	0,545	0,554	0,455	59,6	369
HS	0,727	0,660	0,727	84,8	210
HL-M	0,545	0,555	0,455	60,3	317
HS-M	0,636	0,633	0,727	80,4	102
HL-N	0,545	0,547	0,273	55,8	52
HS-N	0,727	0,685	0,727	88,9	108
H1-M	0,545	0,588	0,545	71,3	202
H2-M	0,545	0,561	0,455	59,4	217
H1-N	0,636	0,596	0,545	77,4	84
H2-N	0,727	0,647	0,727	78,7	76
H1L	0,545	0,575	0,545	68,1	182
H2L	0,545	0,533	0,455	51,3	187
H1S	0,636	0,648	0,636	81,7	104
H2S	0,727	0,672	0,727	87,7	106
H1L-M	0,545	0,574	0,545	68,9	148
H2L-M	0,545	0,538	0,455	52,7	169
H1L-N	0,545	0,578	0,545	64,7	34
H2L-N	0,364	0,490	0,273	38,9	18
H1S-M	0,636	0,626	0,636	77,8	54
H2S-M	0,682	0,640	0,727	83,3	48
H1S-N	0,636	0,671	0,636	86,0	50
H2S-N	0,727	0,697	0,727	91,4	58

En cuanto al valor de la moda, MAR más frecuentemente encontrado en cada población de aislados considerada, mostró valores inferiores a 0,5 para el grupo formado por todos los aislados sobre medio marino (indicado como HM en la tabla 9) y el subgrupo de éste constituido por los de la fase líquida (HL-M) e incluso considerando todos los de esta fase (HL). Igualmente ocurre para los subgrupos de aislados correspondientes a la zona H2 obtenidos sobre medio marino (H2-M) y a los procedentes de la fase líquida (H2L), al igual que para el subgrupo de éste constituido por los obtenidos sobre medio marino (H2L-M). Un valor muy inferior se ha determinado para los aislados sobre medio nutritivo de esta misma muestra y fase (H2L-N), aunque en este caso el número de aislados en este subgrupo es muy bajo (N=18) y los valores podrían no ser significativos, por otra parte este mismo valor de moda se observa si incluimos todos los

aislados en medio nutritivo de la fase acuosa (HL-N) y en este caso el número de aislados considerados es apreciablemente mayor (N=52). Valores ligeramente superiores a 0,5 se observan para el grupo de los aislados procedentes de la zona de muestreo H1, para los subgrupos de éste considerados según su medio de aislamiento (H1-M y H1-N), para el subgrupo correspondiente a la fase líquida (H1L), y para los subgrupos de éste considerando independientemente los procedentes de cada medio de aislamiento (H1L-M y H1L-N). Valores superiores de moda se han encontrado para los distintos subgrupos considerados de la fase sedimento de la zona H1 (H1S, H1S-M y H1S-N). Los valores más elevados de la moda se observan cuando se consideró el conjunto de todos los aislados obtenidos de la ría de Huelva (HT), con el mismo valor para el subgrupo de éstos que fueron aislados sobre medio nutritivo (HN), para los aislados de la fase sedimento en su conjunto, y sus subgrupos en uno u otro medio (HS-M y HS-N) y para los de la zona H2 en su conjunto y sus subgrupos sobre medio nutritivo (H2-N) o a partir del sedimento (H2S), de entre los cuales también tuvieron este valor máximo de la moda tanto los obtenidos sobre medio marino (H2S-M) como sobre nutritivo (H2S-N).

Los datos obtenidos de las medianas (tabla 9) muestran en aproximadamente un 50% de los grupos de aislados considerados, distribuciones de los valores de MAR desplazadas hacia valores superiores a las medias correspondientes, indicando una distribución fuera de la normalidad con una asimetría negativa. Como se puede apreciar, con excepción de los aislados procedentes de la fase líquida de la zona H2 y aislados sobre medio nutritivo (H2L-N), los valores de la mediana y de la media son superiores a 0,5 en todos los grupos de aislados considerados.

Por otro lado analizando los valores de las medias con valores superiores a 0,5, el valor más bajo fue el observado para el grupo de aislados correspondientes a la fase líquida de la zona H2 (H2L) y dentro de ésta al grupo de aislados sobre medio marino (H2L-M), mientras que el valor más alto corresponde al subgrupo de aislados de esta misma zona procedentes del sedimento y obtenidos sobre medio nutritivo (H2S-N). Aunque con valores de la media inferiores a los de la zona H2, esta

diferencia se observa también entre las fases líquida y el sedimento de la zona H1 ( $H1L < H1S$ ), aunque con menor diferencia, y tanto en medio marino como en nutritivo ( $H1L-M < H1S-M$ , y  $H1L-N < H1S-N$ ). En particular, como en el caso de la zona H2, con el máximo valor de la media para el grupo de aislados sobre medio nutritivo del sedimento ( $H1S-N$ ). Si consideramos las fases líquida y sedimento englobando todos los aislados de la ría, la media es mayor en los de la fase sedimento ( $HS > HL$ ) y en ambos medios de cultivo ( $HS-M > HL-M$  y  $HS-N > HL-N$ ).

El análisis de los porcentajes de aislados de cada subgrupo con MAR superiores a 0,5 (tabla 9) muestra valores mayores para los grupos de aislados sobre medio nutritivo, que para los de medio marino, tanto globalmente ( $HN > HM$ ) como considerando las dos zonas de muestreo por separado ( $H1-N > H1-M$  y  $H2-N > H2-M$ ), o los aislados del sedimento de ambas zonas ( $H1S-N > H1S-M$  y  $H2S-N > H2S-M$ ), o los grupos de todos los aislados obtenidos del sedimento de la ría ( $HS-N > HS-M$ ). Este efecto se invierte en el caso de considerar solo los aislados de las fases líquidas de toda la ría ( $HL-M > HL-N$ ) y de ambas zonas de muestreo ( $H1L-N < H1L-M$  y  $H2L-N < H2L-M$ ). En general los grupos de aislados considerados en las dos zonas de muestreo tienen porcentajes mayores para los aislados de los sedimentos que para los de las fases líquidas ( $H1S > H1L$  y  $H2S > H2L$ ) y por tanto también considerados conjuntamente ( $HS > HL$ ). Comparando los grupos equivalentes de las dos zonas de muestreo se observa que considerando todos los aislados de cada zona el porcentaje de aislados con  $MAR > 0,5$  es superior entre los aislados de la zona H1 ( $H1 > H2$ ), al igual que si consideramos independientemente los aislados sobre medio marino ( $H1-M > H2-M$ ), efecto que no se observa si consideramos los de medio nutritivo ( $H1-N \sim H2-N$ ). Si consideramos las fases líquidas también obtenemos mayores porcentajes en la de la zona H1 ( $H1L > H2L$ ), ocurriendo lo mismo tanto si consideramos los subgrupos de esta fase en medio marino o nutritivo ( $H1L-M > H2L-M$  y  $H1L-N > H2L-N$ ). En la fase sedimento se observa, por el contrario, que los mayores porcentajes se presentan entre los aislados de la zona H2 que entre los de la H1, tanto en su conjunto

(H2S<H1S) como considerados grupos independientes según el medio de aislamiento (H2S-M<H1S-M y H2S-N<H1S-N).

Entre los aislados obtenidos se encontraron un total de 143 perfiles de multirresistencia diferentes, distribuidos según se muestra en la tabla 10.

**Tabla 10.** Número de perfiles de multirresistencia detectados en cada muestra y medio.

Muestra	Medio de cultivo	Nº de perfiles
H1L	M	50
	N	25
H2L	M	54
	N	13
H1S	M	25
	N	35
H2S	M	23
	N	11

#### 4.1.4.3. Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según las zonas de muestreo y los medios de cultivo

Se emplearon los parámetros de tablas de contingencia y pruebas de contraste de Chi-cuadrado para valorar la relación de resistencia de los aislados a cada uno de los antibióticos con las zonas de muestreo o con los medios de aislamiento.

Analizando los porcentajes de aislados resistentes a cada antibiótico según las muestras de procedencia (tabla 11), se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre las muestras (H1L, H2L, H1S y H2S) prácticamente para todos los antibióticos (con la excepción de *Sm* ( $p = 0,351$ )).

**Tabla 11.** Porcentajes de aislados resistentes a los antibióticos según las muestras. Diferencias significativas (\*).

	H1L (%)	H2L (%)	H1S (%)	H2S (%)	$\chi^2$ de Pearson	p
Cloranfenicol	13,7	11,8	26,0	49,1	65,322	<0,001*
Ceftazidima	66,5	52,4	84,6	91,5	62,288	<0,001*
Eritromicina	17,6	10,7	51,0	60,4	116,545	<0,001*
Kanamicina	41,8	44,9	51,0	28,3	12,255	0,007*
Ác. Nalidíxico	81,3	79,1	85,6	95,3	14,440	0,002*
Rifampicina	27,5	21,4	40,4	26,4	12,182	0,007*
Estreptomicina	88,5	88,2	88,5	94,3	3,278	0,351
Tetraciclina	78,0	86,1	60,6	42,5	72,475	<0,001*
Trimetoprima	86,8	75,9	80,8	96,2	22,664	<0,001*
Vancomicina	30,8	16,0	44,2	54,7	53,417	<0,001*



Comparando las muestras de sedimento y de agua de cada zona de muestreo se observó que, entre los aislados procedentes de la zona H1, el porcentaje de resistentes a *Cc*, *Cz*, *Em*, *Rp* o *Vm* es mayor en el sedimento (H1S) que en la fase líquida (H1L) ( $p < 0,05$ ). Para los resistentes a *Tc* ocurrió lo contrario ( $p = 0,002$ ). No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de resistentes a *Km*, *Nx*, *Sm* o *Tm* procedentes de ambas fases. Para los aislados procedentes de la zona H2 se observó que los aislados originarios del sedimento (H2S) contienen un porcentaje de resistentes mayor respecto a los de la fase líquida (H2L) ( $p < 0,05$ ) para los antibióticos *Cc*, *Cz*, *Em*, *Nx*, *Tm* o *Vm*. En cambio, son superiores los porcentajes de resistentes de la muestra H2L respecto a los de la muestra H2S para los antibióticos *Km* o *Tc* ( $p < 0,01$ ). No se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de los aislados resistentes a *Rp* o *Sm* de ambas fases.

Al comparar las fases líquidas de ambas zonas, se observaron porcentajes mayores de aislados resistentes a *Cz*, *Tm* o *Vm* entre los aislados de la zona H1 que entre aquellos procedentes de la zona H2 ( $p < 0,05$ ). Para los resistentes a *Tc* el porcentaje es mayor en la zona H2 ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de los resistentes a *Cc*, *Em*, *Km*, *Nx*, *Rp* o *Sm* para ambas zonas de muestreo.

De igual forma fueron comparadas las muestras de sedimentos de las dos zonas. Los resultados indican que los porcentajes de resistentes a *Cc*, *Nx* o *Tm* de la zona H2 son superiores a los de la zona H1 ( $p < 0,05$ ), al contrario de lo que ocurrió para los resistentes a *Km*, *Rp* o *Tc* ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de resistentes a *Cz*, *Em*, *Sm* o *Vm* procedentes de los sedimentos de ambas zonas.

Considerando los medios de aislamiento (tabla 12), se observó que a excepción de para *Rp* y *Sm* ( $p = 0,106$  y  $p = 0,210$ , respectivamente), existen diferencias significativas entre los porcentajes de resistentes a todos los antibióticos probados ( $p < 0,05$ ), siendo mayor el porcentaje de resistentes a *Cc*, *Cz*, *Em*, *Tm* o *Vm* entre los aislados sobre medio nutritivo

que entre los obtenidos sobre medio marino. Se encontraron resultados opuestos para los resistentes a *Km*, *Nx* y *Tc*. En definitiva el orden de mayor a menor de los porcentajes de resistentes según los medios fueron: *Tm* > *Cz* > *Sm* > *Em* > *Nx* > *Vm* > *Cc* > *Rp* > *Km* > *Tc* en medio nutritivo y *Tc* > *Sm* > *Nx* > *Tm* > *Cz* > *Km* > *Rp* > *Vm* > *Cc* > *Em* en medio marino.

**Tabla 12.** Porcentajes de aislados resistentes a los antibióticos según los medios de aislamiento. Diferencias significativas (\*)

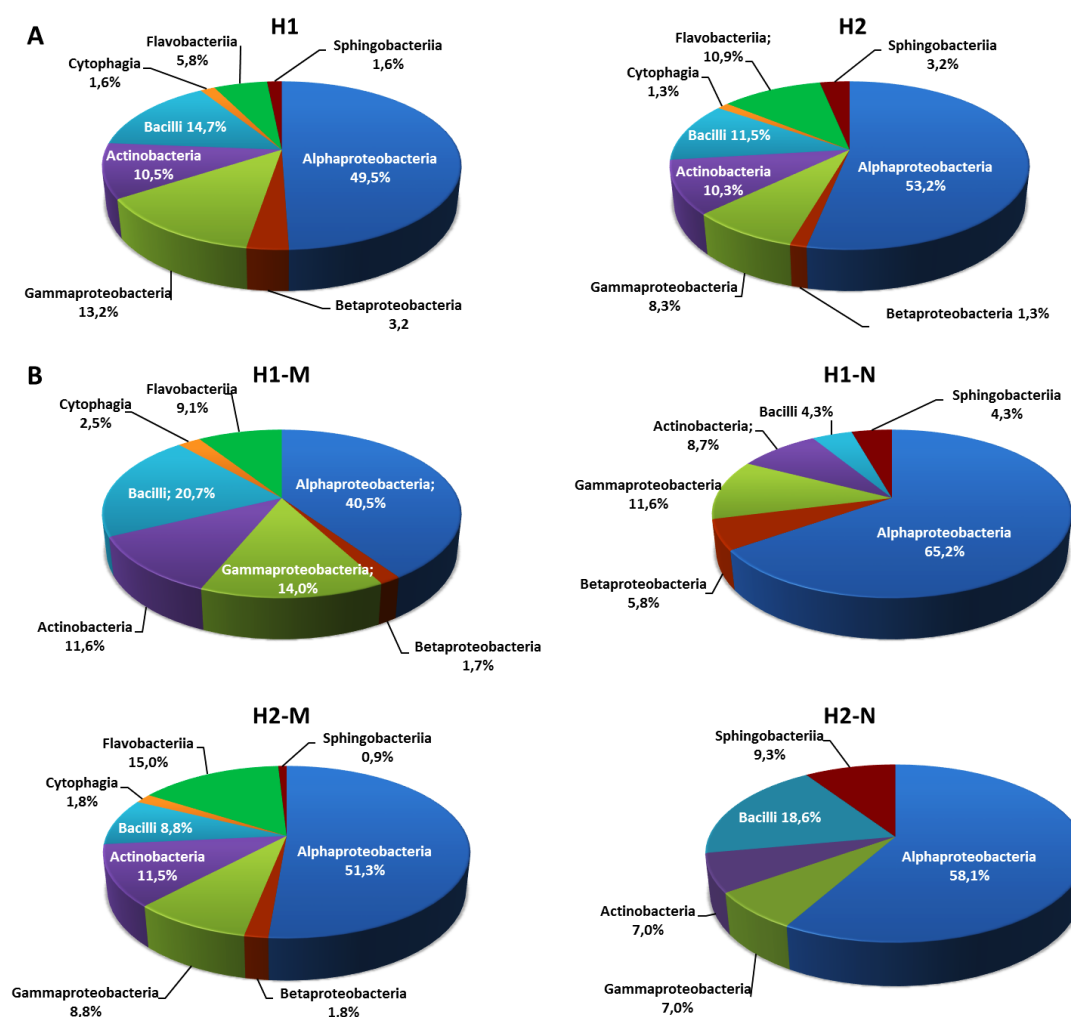
	Medio de cultivo		$\chi^2$ de Pearson	p
	Nutritivo (%)	Marino (%)		
<b>Cloranfenicol</b>	46,3	12,4	77,874	<0,001*
<b>Ceftazidima</b>	87,5	63,0	32,936	<0,001*
<b>Eritromicina</b>	77,5	10,7	249,676	<0,001*
<b>Kanamicina</b>	28,8	47,0	15,863	<0,001*
<b>Ác. Nalidíxico</b>	75,6	87,1	11,332	0,001*
<b>Rifampicina</b>	32,5	25,8	2,618	0,106
<b>Estreptomicina</b>	86,9	90,5	1,573	0,210
<b>Tetraciclina</b>	13,8	92,8	351,646	<0,001*
<b>Trimetoprima</b>	89,4	81,9	4,848	0,028*
<b>Vancomicina</b>	66,3	20,0	112,108	<0,001*

#### 4.1.4.4. Asignación filogenética de aislados seleccionados

Aquellos aislados que presentaban perfiles de resistencia distintos fueron elegidos para ser adscritos a grupos filogenéticos concretos. Dentro de los que tenían el mismo perfil, se seleccionaron todos los que formaban colonias con características fenotípicas diferentes (forma, brillo, rugosidad, tamaño, color, etc.). Se eligieron así 346 aislados con el fin de determinar su adscripción filogenética mediante el análisis de las secuencias de sus genes de ARNr 16S. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas y editadas permitió realizar una caracterización filogenética a nivel de clase y género de todos los aislados estudiados, pudiéndose llegar, en algunos casos, a determinar a nivel de especie.

##### 4.1.4.4.1. A niveles de clase y género

Los aislados se pueden adscribir a 8 clases filogenéticas en los porcentajes indicados: *Alphaproteobacteria* (51,2%), *Bacilli* (13,3%), *Gammaproteobacteria* (11,0%), *Actinobacteria* (10,4%), *Flavobacteriia* (8,1%), *Betaproteobacteria* (2,3%), *Sphingobacteriia* (2,3%) y *Cytophagia* (1,4%). Estas clases se distribuyeron según zonas de procedencia y los medios de aislamiento empleados como se puede ver en la figura 11.



**Figura 11.** Distribución por clases de las bacterias identificadas. **A:** según las zonas de muestreo H1 y H2, **B:** según zonas de muestreo y medios de aislamiento empleados M: medio marino, N: medio nutritivo.

Las alfaproteobacterias están representadas en porcentajes similares entre los aislados procedentes de ambas zonas de muestreo, aunque el valor es algo mayor entre los de la zona H2. Entre los aislados en uno u otro medio y según la zona de muestreo, el mayor porcentaje se encuentra entre los procedentes de la zona H1 obtenidos sobre medio nutritivo, mientras que, entre los de la zona H2, se distribuyen porcentualmente de forma similar entre los de uno u otro medio, siendo algo mayor el porcentaje entre los obtenidos en nutritivo. Por otra parte, los aislados de la clase *Betaproteobacteria* están representados con un porcentaje mayor entre los de la zona H1, en relación a los de la z H2, estando presentes en mayor proporción entre los de medio nutritivo. Los

procedentes de la zona H2 fueron obtenidos exclusivamente sobre medio marino. Los aislados de la clase *Gammaproteobacteria* fueron proporcionalmente más abundantes entre los de la zona H1, de la que fueron aislados sobre ambos medios en proporción parecida, al igual que en el caso de los de la zona H2. Los miembros de la clase *Bacilli*, están representados entre los obtenidos en ambas zonas de muestreo en proporción similar, aunque fueron algo más abundantes proporcionalmente entre los aislados de la zona H1. Entre los aislados de esta zona, los miembros de esta clase están notablemente mejor representados entre los aislados en medio marino, pero ocurrió al contrario entre los de la zona H2. Los miembros de la clase *Actinobacteria* estaban en porcentajes casi idénticos entre los de ambas zonas de muestreo, con porcentajes mayores entre los de medio marino que entre los de nutritivo, en ambas zonas de muestreo. Los aislados de la clase *Cytophagia* procedían en porcentajes similares de ambas zonas. No se aislaron bacterias de esta clase sobre medio nutritivo en ninguna de las dos zonas. Miembros de las clases *Flavobacteriia* y *Sphingobacteriia* representaban un porcentaje aproximadamente el doble entre los de la zona de muestreo H2 que entre los de la H1 y, mientras que de la zona H1 solo se aislaron flavobacterias sobre medio marino y esfingobacterias sobre el nutritivo, de la zona H2, aunque básicamente ocurrió lo mismo, sí que fueron aisladas algunas esfingobacterias del medio marino, aunque en muy baja proporción con respecto al total de aislados de esta zona obtenidos sobre este medio.

De todas las clases encontradas, *Alphaproteobacteria* fue la que presentó la mayor diversidad a nivel de género con un total de 15 (tabla 13). En cambio, las clases *Cytophagia* y *Sphingobacteriia* apenas estuvieron representadas por 2 géneros cada una. En conjunto, las bacterias identificadas se distribuyeron en 51 géneros diferentes, de los cuales un 27,5% se hallaron solo en las muestras de la zona H1, un 19,6% son propios de la zona H2, y el restante 52,9% lo forman géneros que fueron detectados en ambas zonas de muestreo.

**Tabla 13.** Distribución de los aislados según los géneros detectados en cada clase. Las celdas de color verde indican la presencia de aislados del género indicado en las muestras H1L, H2L, H1S y H2S y según el medio de aislamiento M: medio marino y N: medio nutritivo

Clase	Género (% en la clase)	H1L M	H2L M	H1S M	H2S M	H1L N	H2L N	H1S N	H2S N
<b>Actinobacteria</b>	<i>Brachybacterium</i> (5,6%)								
	<i>Cellulosimicrobium</i> (16,7%)								
	<i>Leucobacter</i> (2,8%)								
	<i>Microbacterium</i> (52,7%)								
	<i>Mycobacterium</i> (2,8%)								
	<i>Phycococcus</i> (8,3%)								
	<i>Streptomyces</i> (8,3%)								
	<i>Tsukamurella</i> (2,8%)								
<b>Alphaproteobacteria</b>	<i>Altererythrobacter</i> (16,4%)								
	<i>Blastomonas</i> (0,6%)								
	<i>Bosea</i> (4,0%)								
	<i>Brevundimonas</i> (6,8%)								
	<i>Citromicrobium</i> (0,6%)								
	<i>Erythrobacter</i> (28,8%)								
	<i>Lutibacterium</i> (6,2%)								
	<i>Methylobacterium</i> (9,6%)								
	<i>Novosphingobium</i> (0,6%)								
	<i>Ochrobactrum</i> (10,2%)								
	<i>Ponticaulis</i> (7,9%)								
	<i>Sinorhizobium</i> (0,6%)								
	<i>Sphingobium</i> (0,6%)								
	<i>Sphingomonas</i> (1,1%)								
	<i>Sphingopyxis</i> (6,2%)								
<b>Bacilli</b>	<i>Bacillus</i> (56,5%)								
	<i>Lysinibacillus</i> (8,7%)								
	<i>Paenibacillus</i> (23,9%)								
	<i>Paenisporosarcina</i> (6,5%)								
	<i>Solibacillus</i> (2,2%)								
	<i>Virgibacillus</i> (2,2%)								
<b>Betaproteobacteria</b>	<i>Achromobacter</i> (50,0%)								
	<i>Advenella</i> (25,0%)								
	<i>Brachymonas</i> (12,5%)								
	<i>Neisseria</i> (12,5%)								
<b>Cytophagia</b>	<i>Algoriphagus</i> (60,0%)								
	<i>Cyclobacterium</i> (40,0%)								
<b>Flavobacteriia</b>	<i>Arenibacter</i> (14,3%)								
	<i>Joostella</i> (21,4%)								
	<i>Leeuwenhoekiella</i> (3,6%)								
	<i>Mesonina</i> (35,7%)								
	<i>Salegentibacter</i> (3,6%)								
	<i>Salinimicrobium</i> (3,6%)								
	<i>Zunongwangia</i> (3,6%)								
	<i>Tenacibaculum</i> (14,3%)								
<b>Gammaproteobacteria</b>	<i>Acinetobacter</i> (2,6%)								
	<i>Halomonas</i> (2,6%)								
	<i>Marinobacter</i> (5,3%)								
	<i>Pseudoalteromonas</i> (57,9%)								
	<i>Pseudomonas</i> (21,1%)								
	<i>Stenotrophomonas</i> (10,5%)								
<b>Sphingobacteriia</b>	<i>Chitinophaga</i> (25,0%)								
	<i>Sphingobacterium</i> (75,0%)								

#### 4.1.4.4.2. A nivel de especie

Al analizar las secuencias de ARNr 16S obtenidas para los distintos aislados nos encontramos que, aunque la asignación a nivel de género era clara en la mayoría de los casos, no ocurría lo mismo a nivel de especie para un considerable número de aislados. En estos casos las secuencias mostraban porcentajes de identidad de hasta el 100% con secuencias de la base de datos asignadas a diferentes especies, observándose una cierta variabilidad dentro de cada especie superior o similar a la variabilidad interespecífica. Como consecuencia de esto y tras intentar hacer estudios filogenéticos mediante algoritmos de reconstrucción de árboles filogenéticos no fue posible asignar un número elevado de aislados a especies concretas, ya que el recorte necesario de los extremos de las secuencias alineadas, eliminaba parte de la información y disminuía la especificidad de las mismas. Por ello la asignación se realizó utilizando toda la secuencia disponible del ARNr 16S, mediante análisis de los resultados de búsqueda utilizando el algoritmo BLAST como se indica en la sección de materiales y métodos. Los resultados se recogieron en la tabla 14, en la que se indican las secuencias correspondientes a especies identificadas en la base de datos con mayor porcentaje de identidad con las secuencias de los aislados. Aquellos aislados para los que la secuencia disponible no pudo distinguir en porcentaje de identidad entre dos especies concretas, ambas especies se han propuesto como posibles. Cuando fueron más de dos especies las que mostraban igual nivel de identidad, se indican en la tabla con el nombre del género seguido de "sp.", a excepción de aquellos aislados pertenecientes al denominado complejo *Bacillus cereus/thuringiensis/anthracis* que se indicó como tal. Cuando la secuencia identificó, con porcentaje superior al 97%, solo secuencias no asignadas a una especie concreta, igualmente se indicó en la tabla como el género seguido de "sp.", aunque en estos casos se indica el número de acceso de la secuencia con mayor porcentaje de identidad. Los análisis realizados han permitido determinar la proximidad filogenética de 262 aislados a 71 especies concretas y de 24 aislados a 13 parejas de dos especies posibles, resultando infructuosa la determinación de una especie única

filogenéticamente próxima para el resto de los aislados. Se ha utilizado el término “genomovar” para indicar cada una de las secuencias distintas de los aislados correspondientes a una misma especie según el estudio realizado.

**Tabla 14.** Especies filogenéticamente más próximas a los aislados en base a las secuencias de sus ARNr 16S y su distribución según muestras y medios de aislamiento. N° ais.: número de aislados; N° gv.: número de genovares encontrados.

Especie	Máx. % ident.	Nº acceso secuencias máxima identidad	Nº ais.	Nº gv.	Nº aislados (Nº genómovares)									
					H1L-M	H2L-M	H1S-M	H2S-M	H1L-N	H2L-N	H1S-N	H2S-N		
<i>Achromobacter</i> sp.	99-100		2	2				1(1)				1(1)		
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	100	AF439314	2	1				1(1)					1(1)	
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	100	KC660133	1	1						1(1)				
<i>Advenella incenata</i>	100	KF844056	1	1				1(1)						
<i>Advenella incenata/kashmirensis</i>	100	KJ689309/HQ845175	1	1			1(1)							
<i>Algoriphagus antarcticus</i>	99	AY771733	3	3	1(1)	2(2)								
<i>Altererythrobacter dongtanensis</i>	98	NR_108695	1	1						1(1)				
<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98	NR_112721	25	3	2(1)	5(1)	10(2)	3(1)	1(1)	4(2)				
<i>Altererythrobacter luteolus</i>	100	NR_043151	2	1		1(1)		1(1)						
<i>Altererythrobacter marensis/epoxidivorans</i>	98	JQ806736/NR_043706	1	1			1(1)							
<i>Arenibacter echinorum</i>	99	EF536749, KF911336	4	1		4(1)								
<i>Bacillus cereus</i>	98	HM161868	1	1						1(1)				
<i>Bacillus cereus/thuringiensis/anthracis</i>	100	KP717557/ KJ676099/ KJ009486/ KP788033/ CP010106/ KP342195	4	1						1(1)	3(1)			
<i>Bacillus clausii</i>	100	FN397454	2	1	1(1)			1(1)						
<i>Bacillus galliciensis</i>	99-100	NR_116886	15	4	15(4)									
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	HM161868, CP012110	3	2	3(2)									
<i>Blastomonas</i> sp.	99	FN397673	1	1				1(1)						1(1)
<i>Bosea minatitanensis</i>	99	NR_028787	1	1										
<i>Bosea thiooxidans</i>	99	AJ250800	3	1						3(1)				
<i>Bosea vestrisii</i>	99	NR_028799	3	1		1(1)				1(1)		1(1)		
<i>Brachybacterium faecium</i>	99	KM186613	2	2	1(1)	1(1)								
<i>Brachymonas chironomi</i>	99	NR_116284	1	1								1(1)		
<i>Brevundimonas bullata</i>	99	EU977700	1	1		1(1)								
<i>Brevundimonas diminuta</i>	99-100	KJ782618, KT000269	5	2						1(1)			4(2)	
<i>Brevundimonas</i> sp.	99		1	1									1(1)	
<i>Brevundimonas vesicularis/olei</i>	99-100	KM873029/NR_117268	5	3						3(2)		2(2)		
<i>Cellulosimicrobium cellulans/funkei</i>		KM378605/ KM263187/												
	100	KF040973/ JQ659856/ KC429587	6	2	2(1)		3(2)	1(1)						
<i>Chitinophaga niastensis</i>	97	AB682429	1	1										
<i>Chitinophaga terrae/ jiangningensis</i>	97	AB682429/NR_118590	1	1							1(1)			
<i>Citromicrobium bathyomarinum</i>	99	KF500391	1	1	1(1)						1(1)			



Tabla 14. Cont. 1.

Especie	Máx. % ident.	Nº acceso secuencias máxima identidad	Nº aís.	Nº gv.	Nº aislados (Nº genomovares)									
					H1L-M	H2L-M	H1S-M	H2S-M	H1L-N	H2L-N	H1S-N	H2S-N		
<i>Cyclobacterium marinum</i>	100	KC534179	2	2	2(2)									
<i>Erythrobacter aquimaris</i>	99	NR_025789	3	3	2(2)			1(1)						
<i>Erythrobacter citreus</i>	99-100	GQ169076, KC534371, LC020229, KC534169	11	9	6(5)	2(2)	1(1)	1(1)					1(1)	
<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	99	FN431786	1	1	1(1)									
<i>Erythrobacter gangjinensis</i>	97-98	NR_116318	14	3	6(2)	4(2)	3(1)							
<i>Erythrobacter longus</i>	99	AM691106	1	1		1(1)								
<i>Erythrobacter nanhaisediminis</i>	99-100	KP342254, JQ762409	6	5		1(1)		5(4)						
<i>Erythrobacter seohaensis</i>	100	NR_025817	2	2				2(2)						
<i>Erythrobacter sp.</i>	99	EF512713	2	1	1(1)	1(1)								
<i>Erythrobacter vulgaris</i>	99-100	KF500392, KM387388, GQ169078, LK391640	9	7	1(1)	5(5)	1(1)	2(2)						
<i>Erythrobacter vulgaris/flavus</i>	99	LK391640/EF512715	1	1		1(1)								
<i>Erythrobacter vulgaris/litoralis</i>	99	KM387388/NR_074349	1	1	1(1)									
<i>Halomonas lionensis</i>	99	NR_126205	1	1		1(1)								
<i>Joostella marina</i>	100	KF740552, KP706828	6	1	5(1)	1(1)								
<i>Leeuwenhoekella marinoflava</i>	99	KP860626	1	1	1(1)									
<i>Leucobacter komagatae</i>	100	KC492057	1	1	1(1)									
<i>Luibacterium anuloederans</i>	99-100	NR_115118	11	7	5(3)	4(3)	1(1)	1(1)						
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100	KM983015, KP192023, KM983017	3	1			3(1)							
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	99	KM378616	1	1		1(1)								
<i>Marinobacter adhaerens/flavimaris</i>	100	KP645214/AB617558	2	1	2(1)									
<i>Mesonoria algae</i>	98-100	NR_113896	9	5	2(2)	7(4)								
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	100	NR_041028, HM245434	16	1								16(1)		
<i>Methylobacterium sp.</i>	99		1	1								1(1)		
<i>Microbacterium lacus/aurum</i>	99	KJ812391/EU714343	1	1							1(1)			
<i>Microbacterium sp.</i>	97-100		18	7	1(1)	5(5)	2(1)	5(1)	1(1)	4(2)				
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	100	JX266704	1	1					1(1)					
<i>Neisseria sp.</i>	100	FJ502346	1	1						1(1)				
<i>Novosphingobium sp./</i> <i>Altererythrobacter indicus</i>	99	AY690709/NR_043783	1	1		1(1)								
<i>Ochrobactrum anthropi/intermedium</i>	100	KP282813/KP259604	2	1						2(1)				
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	100	KM462855	1	1					1(1)					
<i>Ochrobactrum pecoris</i>	99	NR_117053	2	1							2(1)			
<i>Ochrobactrum pseudogrignonnense</i>	100	KF844052, KP771804	3	1					2(1)	1(1)				
<i>Ochrobactrum</i> <i>pseudogrignonnense/anthropi</i>	100	KP771804/JQ612513	1	1						1(1)				

Tabla 14. Cont. 2.

Especie	Máx. % ident.	N° acceso secuencias máxima identidad	N° ais.	N° gv.	N° aislados (N° genotipos)							
					H1L-M	H2L-M	H1S-M	H2S-M	H1L-N	H2L-N	H1S-N	H2S-N
<i>Ochrobactrum</i> sp.	99-100		9	3					4(2)		5(2)	
<i>Paenibacillus cineris/favisporus</i>	99	JN592451/JN867753	1	1					1(1)			
<i>Paenibacillus lautus</i>	99-100	KM203759, JF798384, JF496327, JX296361	5	5	1(1)	1(1)	1(1)	2(2)				
<i>Paenibacillus</i> sp.	99-100		5	4		1(1)	1(1)				1(1)	2(1)
<i>Paenisporosarcina</i> sp.	99		3	1			1(1)	2(1)				
<i>Phycococcus ochangensis</i>	98	GQ344407	3	3		1(1)	2(2)					
<i>Ponticaulis korensis</i>	98	NR_044608	14	5	6(3)	8(3)						
<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99	FR750943	2	2		2(2)						
<i>Pseudoalteromonas maringlutinosa</i>	98-99	FJ457161, JQ867499	5	2	4(1)		1(1)					
<i>Pseudoalteromonas pydzensis</i>	99	KC534212	1	1	1(1)							
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	99-100		5	2		4(2)	1(1)					
<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	99-100	HM130919	9	2		2(1)	7(1)					
<i>Pseudomonas mendocina</i>	100	EU216597	1	1					1(1)			
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	100	LK391695	4	1							4(1)	
<i>Pseudomonas putida</i>	100	KR054999	1	1				1(1)				
<i>Pseudomonas</i> sp.	100		1	1					1(1)			
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	AJ312161	1	1					1(1)			
<i>Salmonella enteritidis</i>	99	KF500388	1	1	1(1)							
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	FJ425217	1	1		1(1)						
<i>Salmonella enteritidis</i>	99	EU647697	1	1							1(1)	
<i>Salmonella enteritidis</i>	99	LN870317	1	1				1(1)				
<i>Shigella flexneri</i>	99	NR_118238	2	1				1(1)			1(1)	
<i>Shigella flexneri</i>	97-99	NR_108440	3	2					1(1)	2(1)		
<i>Shigella flexneri</i>	97	NR_074508	1	1					1(1)			
<i>Shigella flexneri</i>	99	KJ676967	1	1					1(1)			
<i>Shigella flexneri</i>	100		3	2					2(1)			1(1)
<i>Shigella flexneri</i>	99	NR_025814	1	1		1(1)						
<i>Shigella flexneri</i>	100	JQ342928	1	1					1(1)			
<i>Shigella flexneri</i>	99	KC756877, DQ781321	5	3		5(3)						
<i>Shigella flexneri</i>	99	AB675371	1	1					1(1)			
<i>Shigella flexneri</i>	98	AB681850	2	2					1(1)		1(1)	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	KR083021, KP185140, KP986951, JX262398	4	4			1(1)		1(1)	1(1)		
<i>Streptomyces indicus</i>	99	NR_108182	1	1			1(1)					
<i>Streptomyces</i> sp.	100		1	1								1(1)
<i>Streptomyces xiamenensis</i>	100	CP009922	1	1			1(1)					
<i>Tenacibaculum galliaicum</i>	99	NR_042631	4	2		3(2)		1(1)				

Tabla 14. Cont. 3.

Especie	Máx. % ident.	Nº acceso secuencias máxima identidad	Nº ais.	Nº gv.	Nº aislados (Nº genomovares)								
					H1L-M	H2L-M	H1S-M	H2S-M	H1L-N	H2L-N	H1S-N	H2S-N	
<i>Tsukamurella inchoensis</i>	100	AB907635	1	1									1(1)
<i>Virgibacillus carmonensis</i>	99	NR_025481	1	1		1(1)							
<i>Zunongwangia profunda</i>	99	LN651154	1	1									1(1)

#### 4.1.4.4.2.1. Índices de biodiversidad a nivel de especie

La diferencia en los niveles de biodiversidad a nivel de especie de las bacterias aisladas e identificadas en cada muestra, se determinó mediante el cálculo de los índices de Margalef ( $D_{Mg}$ ), Simpson ( $\lambda$ ) y de Shannon-Wiener ( $H'$ ). Considerando las muestras en su conjunto, los valores de los índices de biodiversidad resultaron ser de:  $D_{Mg}=12,75$ ,  $\lambda=0,97$  (máx. 1) y  $H'=3,76$  (máx. 5). En la tabla 15 se resumen los resultados de los cálculos de los índices mencionados en el que se puede observar que para la zona de muestreo H1 los índices de biodiversidad fueron mayores que para la zona H2. En ambas zona los índices de biodiversidad fueron algo superiores para los aislados de la fase líquida (H1L y H2L) que para los del sedimento (H1S y H2S), siendo esta diferencia mayor en la zona H2. Calculando los índices de biodiversidad para los aislados procedentes de cada una de las zonas, según el medio de aislamiento, se obtuvieron valores en general superiores para los aislados en medio marino comparados con los del medio nutritivo para ambas zonas de muestreo, si bien la diferencia fue notablemente mayor para la zona H2.

**Tabla 15.** Índices de biodiversidad a nivel de especie de los grupos de aislados agrupados según las zonas de muestreo y los medios de aislamiento.  $D_{Mg}$ : índice de Margalef,  $\lambda$ : índice de Simpson y  $H'$ : índice de Shannon-Wiener.

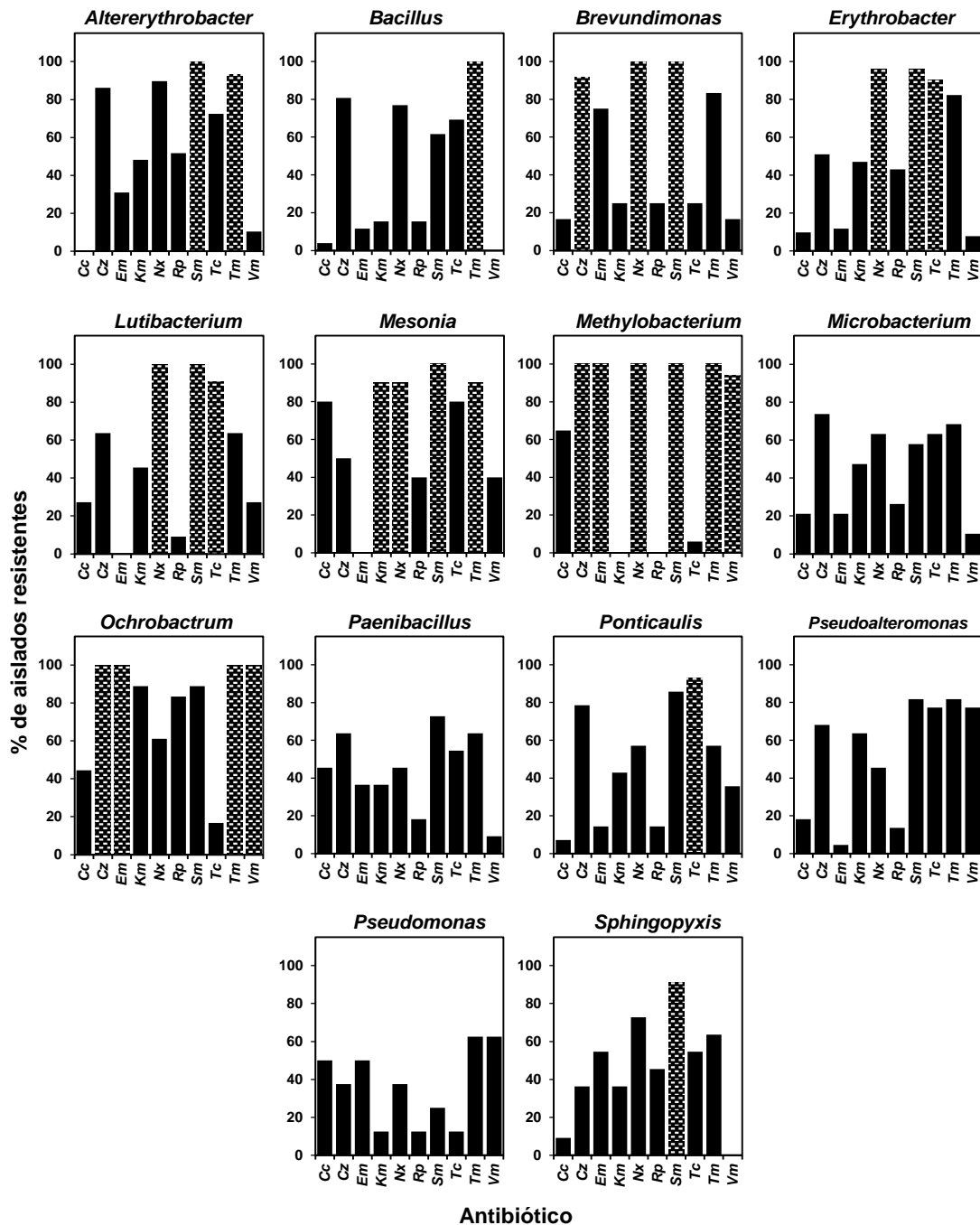
	$D_{Mg}$	$\lambda$	$H'$
H1	10,26	0,96	3,54
H2	8,18	0,94	3,24
H1L	8,13	0,94	3,23
H1S	6,17	0,92	2,92
H2L	6,74	0,94	3,06
H2S	4,50	0,83	2,35
H1-M	6,88	0,93	3,05
H1-N	6,01	0,93	2,97
H2-M	6,49	0,95	3,11
H2-N	3,24	0,69	1,74

#### 4.1.4.5. Prevalencia de los aislados resistentes a los antibióticos según los géneros a los que pertenecen

Se analizó la prevalencia de los aislados resistentes a los antibióticos de los 14 géneros encontrados con un número de aislados igual o superior a 8, considerando conjuntamente los de todas las muestras analizadas que habían sido identificados a nivel de género, para tratar de

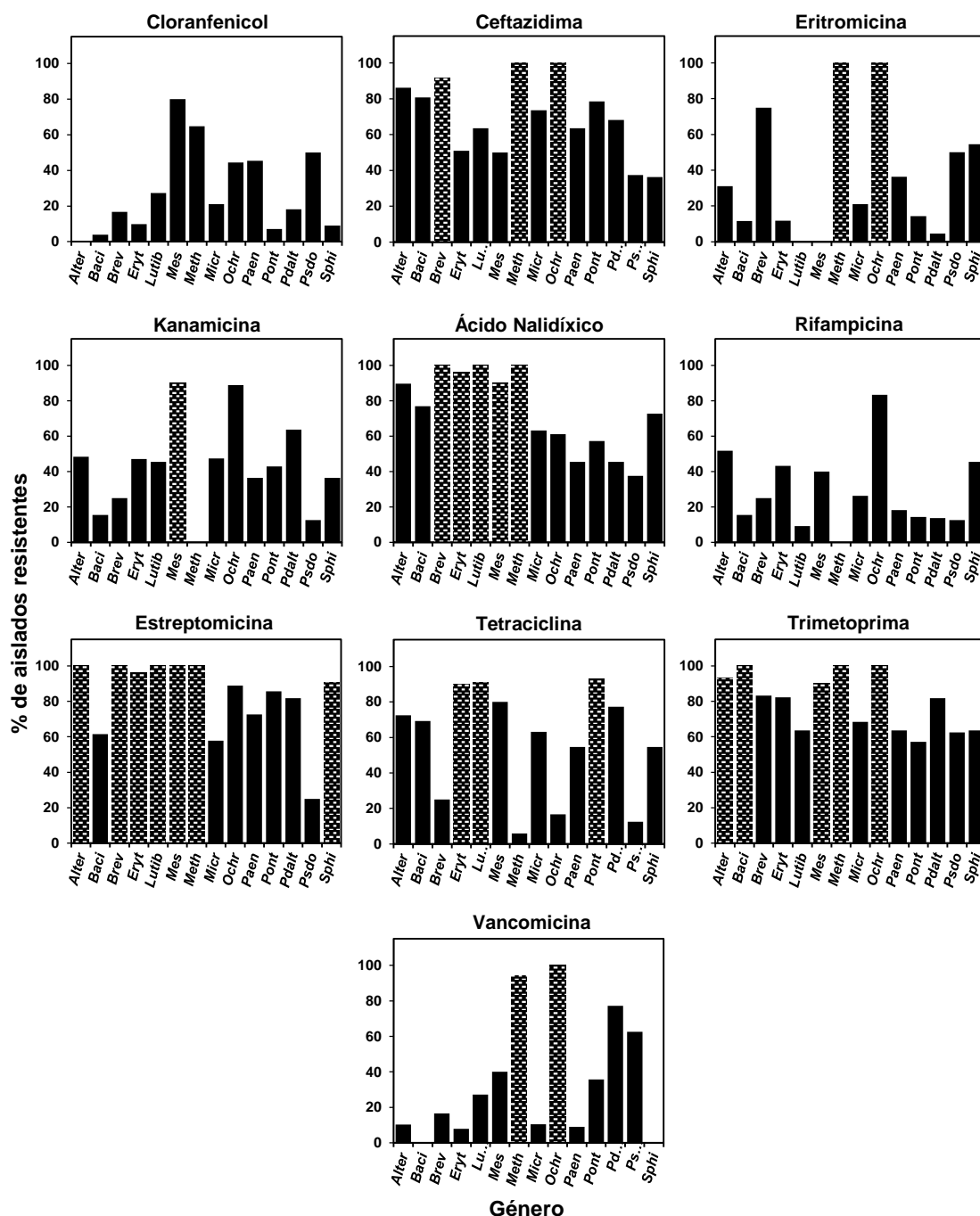
determinar cuáles de las resistencias podrían ser adquiridas, considerando como tales aquellas que no fuesen observadas en todos o casi todos los aislados de cada género. Como un criterio para distinguir entre posibles resistencias adquiridas y aquellas comunes a los aislados de cada género y a las que aquí, para simplificar al referirnos a ellas, denominaremos intrínsecas\*, se estimaron como posiblemente intrínsecas de género aquellas que fueron observadas por un número de aislados  $\geq 90,0\%$  de los pertenecientes a dicho género; para valores inferiores se consideraron como resistencias probablemente adquiridas. Los resultados (figura 12) indican que, con el criterio indicado, la resistencia a cada uno de los antibióticos estudiados, salvo a *Cc* y *Rp*, podría ser intrínseca en al menos uno de los géneros: Algunos géneros se mostraron como intrínsecamente resistentes a 1 antibiótico, como *Bacillus* a *Tm*, *Ponticaulis* a *Tc* y *Sphingopyxis* a *Sm*, a 2 antibióticos, como *Altererythrobacter* a *Sm* y *Tm*, a 3 antibióticos, como *Brevundimonas* a *Cz*, *Nx* y *Sm*, y *Erythrobacter* y *Lutibacterium* a *Nx*, *Sm* y *Tc*, a 4 antibióticos, como *Mesonía* a *Km*, *Nx*, *Sm* y *Tm* y *Ochrobactrum* a *Cz*, *Em*, *Tm* y *Vm*, o a 6 antibióticos, como *Methylobacterium* a *Cz*, *Em*, *Nx*, *Sm*, *Tm* y *Vm*. Para los géneros *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudoalteromonas* y *Pseudomonas* no se encontraron posibles resistencias intrínsecas para ninguno de los antibióticos utilizados. En cambio, en la mayoría de los casos, dentro de cada género se encontraron aislados sensibles a los antibióticos empleados y en algunos casos todos los aislados de un mismo género lo fueron: *Altererythrobacter* a *Cc*, *Mesonía* a *Em*, *Methylobacterium* a *Km* y *Rp* y *Bacillus* y *Sphingopyxis* a *Vm*.

\* **Resistencia intrínseca:** Este concepto se entiende habitualmente como se ha definido en el epígrafe 1.3.1.1. Aquí se utiliza según Walsh y Duffy 2013.



**Figura 12.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos en los géneros indicados. Antibióticos: Cc-Cloranfenicol, Cz-Ceftazidima, Em-Eritromicina, Km-Kanamicina, Nx-Ácido nalidíxico, Rp-Rifampicina, Sm-Estreptomicina, Tc-Tetraciclina, Tm-Trimetoprima y Vm-Vancomicina. ■ – indica porcentajes  $\geq$  a 90,0%.

Si comparamos los distintos antibióticos en cuanto al porcentaje de resistentes en cada género (figura 13), observamos que los que mostraron mayor abundancia relativa de resistentes según el antibiótico, y excluyendo los géneros que se han considerado resistentes intrínsecos a antibióticos



**Figura 13.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos indicados según el género al que pertenecen. Géneros: Alter.: *Altererythrobacter*, Baci.: *Bacillus*, Brev.: *Brevundimonas*, Eryt.: *Erythrobacter*, Lutib.: *Lutibacterium*, Mes.: *Mesononia*, Meth.: *Methylobacterium*, Micr.: *Microbacterium*, Ochr.: *Ochrobactrum*, Paen.: *Paenibacillus*, Pont.: *Ponticaulis*, Pdalt.: *Pseudoalteromonas*, Psdo.: *Pseudomonas*, Sphi.: *Sphingopyxis*. ■ indica porcentajes  $\geq 90$ .

concretos, fueron: para Cc *Mesononia*, para Cz *Altererythrobacter*, seguido de cerca por *Bacillus* y *Ponticaulis*, para Em *Brevundimonas*, para Km y Rp *Ochrobactrum*, para Nx *Altererythrobacter*, para Sm, con valores muy próximos *Ochrobactrum*, *Ponticaulis* y *Pseudoalteromonas*, para Tc

*Mesonia* y muy de cerca *Pseudoalteromonas*, para *Tm* la mayor parte de los géneros mostraron porcentajes de resistentes elevados, superiores al 55,0%, finalmente para *Vm* los géneros *Pseudoalteromonas* y *Pseudomonas*. Por el contrario, sin tener en cuenta aquellos en los que todos los aislados fueron sensibles, los géneros con menor porcentaje de resistentes y por tanto con un mayor porcentaje de aislados susceptibles a los antibióticos fueron: para *Cc* *Bacillus*, para *Cz* *Sphingopyxis*, para *Em* *Pseudoalteromonas*, para *Km* y *Nx* *Pseudomonas*, para *Rp* *Lutibacterium*, para *Sm* *Pseudomonas*, para *Tc* *Methylobacterium*, para *Tm* *Ponticaulis* y para *Vm* *Erythrobacter* seguido muy de cerca por *Paenibacillus*.

Comparando los porcentajes de resistentes en cada género para los distintos antibióticos (figura 13), y excluyendo los posibles resistencias intrínsecas, se observa que algunos de éstos parecen ser capaces de inhibir un bajo número de aislados de cada género, con porcentajes de aislados resistentes en general elevados, como es el caso de los antibióticos *Cz* (86,2-36,4%, N=11,  $\bar{x}=62,7\pm17,1$ ), *Nx* (89,7-37,5%, N=9,  $\bar{x}=61,0\pm16,3$ ), *Sm* (88,9-25,0%, N=7,  $\bar{x}=67,7\pm22,2$ ) y *Tm* (83,3-57,1%, N=10,  $\bar{x}=69,6\pm10,1$ ), y para los cuales, además, se observan posibles resistencias intrínsecas en algunos de los géneros.

Como se puede observar en la figura 13, aquellos antibióticos que fueron capaces de inhibir el crecimiento en porcentajes de aislados de cada género más elevados, considerando todos en su conjunto, y que por tanto fueron los que mostraron menores porcentajes de aislados resistentes fueron *Cc* (80,0-0,0%, N=14,  $\bar{x}=28,4\pm24,6$ ) y *Rp* (83,3-0,0%, N=14,  $\bar{x}=28,4\pm22,1$ ) sin que, además, ningún género se mostrara intrínsecamente resistente a ellos. Un tercer grupo de antibióticos estaría formado por *Em*, *Km*, *Tc* y *Vm*, que se comportan frente a los distintos géneros con efectos que van generalmente desde porcentajes de resistentes muy altos (incluso resistencia intrínseca) hasta porcentajes de resistentes por género muy bajos o cero. Los más bajos fueron a *Em* para *Lutibacterium* (0%) y *Mesonia* (0%), a *Km* para *Methylobacterium* (0%), a *Tc* para *Methylobacterium* (5,9%) y a *Vm* para *Bacillus* (0%) y *Sphingophyxis* (0%). Por el contrario los más elevados fueron a *Em* para *Methylobacterium*



(100%, intrínseca), *Ochrobactrum* (100%, intrínseca) y *Brevundimonas*, (75%), a *Km* para *Mesonía* (90%, intrínseca) y muy de cerca *Ochrobactrum* (88,9%), a *Tc* para *Erythrobacter* (90,2, intrínseca%), *Lutibacterium* (90.9%, intrínseca), *Ponticaulis* (92,9%, intrínseca) y *Mesonía* (80%), y finalmente a *Vm* para *Methylobacterium* (94,1%, intrínseca), *Ochrobactrum* (100%, intrínseca) y *Pseudoalteromonas* (77,3%).

Teniendo esto en cuenta, y excluyendo los aislados de los géneros intrínsecamente resistentes, podemos decir que el porcentaje de aislados resistentes a cada antibiótico que se han encontrado con respecto al total de aislados no intrínsecamente resistentes, determinaría una abundancia de resistentes a cada antibiótico que seguiría el siguiente orden: *Tm* (69,6%) > *Sm* (67,7%) > *Cz* (62,7%) > *Nx* (61,0%) > *Tc* (48,3%) > *Km* (39,2%) > *Cc* = *Rp* (28,4%) > *Em* (25,8%) > *Vm* (24,8%).

#### **4.1.4.6. Análisis de la asociación de las resistencias a dos antibióticos**

Se ha estudiado la probabilidad de que exista alguna asociación entre la resistencia a 2 antibióticos simultáneamente en cada aislado mediante el cálculo del coeficiente Kappa (K) (Altman 1991). Un primer análisis se ha realizado teniendo en cuenta todas las bacterias aisladas de la ría de Huelva. Como se observa en la primera columna de la tabla 16, la más alta concordancia encontrada fue para la pareja *Cc/Vm* (K=0,47; p<0,001; N=579), seguida de la *Cc/Em* (K=0,45 ; p<0,001; N=579) y finalmente para las combinaciones *Em/Vm* y *Nx/Sm* (K=0,42; p<0,001; N=579), aunque en todos estos casos la concordancia calculada se debe considerar como moderada. El resto de las concordancias resultaron concordancias débiles o nulas.

También se determinaron los coeficientes Kappa considerando los distintos aislados de cada género individual (tabla 16), analizando solo los 14 géneros con mayor número de aislados al igual que se hizo en el apartado anterior. Se excluyeron del análisis para cada género aquellas parejas de antibióticos que contuvieran alguno al que es e género se ha considerado intrínsecamente resistente según los resultados indicados en el

apartado anterior. Como se puede observar en general, considerando todas las parejas y todos los géneros analizados, no predominó ninguna pareja de antibióticos en particular con concordancias muy buenas o buenas. En 8 géneros se encontraron concordancias moderadas (una de ellas negativa, indicando la probabilidad estadísticamente significativa de que las resistencias de ambos antibióticos no aparezcan juntas), en 10 las concordancias fueron buenas y 5 lo fueron muy buenas. En el género *Methylobacterium* no se encontró ninguna concordancia de rango superior a débil o nula. En 2 de los géneros aparecieron un número considerable de concordancias; en el caso del género *Paenibacillus* se encontraron 6 concordancias muy buenas: *Cz/Tm* (K=1,00; p=0,001; N=11), *Em/Km* (K=1,00; p=0,001; N=11), *Cc/Em* (K=0,81; p=0,006; N=11), *Cc/Km* (K=0,81; p=0,006; N=11), *Em/Nx* (K=0,81; p=0,006; N=11) y *Km/Nx* (K=0,81; p=0,006; N=11); 8 buenas: *Cz/Sm* (K=0,79; p=0,007; N=11), *Sm/Tm* (K=0,79; p=0,007; N=11), *Cz/Nx* (K=0,65; p=0,022; N=11), *Em/Tc* (K=0,65; p=0,022; N=11), *Km/Tc* (K=0,65; p=0,022; N=11), *Nx/Tm* (K=0,65; p=0,022; N=11), *Rp/Vm* (K=0,62; p=0,026; N=11) y *Cc/Nx* (K=0,63; p=0,036; N=11), y 2 moderadas: *Em/Rp* (K=0,56; p=0,039; N=11); y *Km/Rp* (K=0,56; p=0,039; N=11); en el caso del género *Pseudoalteromonas* se detectó solo una concordancia muy buena, para la pareja *Tm/Vm* (K=0,86; p<0,001; N=22); 4 buenas: *Cz/Km* (K=0,70; p=0,001; N=22), *Sm/Tm* (K=0,69; p=0,001; N=22) y *Cz/Sm* y *Cz/Tm* (K=0,65; p=0,001; N=22); y 13 moderadas: *Sm/Tc*, *Sm/Vm* y *Tc/Tm* (K=0,58; p=0,006; N=22), *Km/Sm* y *Km/Tm* (K=0,56; p=0,003; N=22), *Cz/Vm* (K=0,55; p=0,009; N=22), *Cc/Rp* (K=0,49; p=0,019; N=22), *Tc/Vm* (K=0,48; p=0,024; N=22), *Km/Nx* (K=0,47; p=0,019; N=22), *Km/Tc* y *Km/Vm* (K=0,47; p=0,021; N=22), *Em/Rp* (K=0,46; p=0,010; N=22) y *Cc/Nx* (K=0,42; p=0,015; N=22). Considerando solo las concordancias muy buenas, con alta probabilidad habría una asociación entre la resistencia a los antibióticos: *Nx/Tc* (K=0,81; p<0,001; N=26) en *Bacillus*, *Cc/Tc* (K=1,00; p=0,002; N=10) en *Mesonina*, *Cz/Tm* (K=1,00; p=0,001; N=11), *Em/Km* (K=1,00; p=0,001; N=11), *Cc/Em* y *Cc/Km* (K=0,81; p=0,006; N=11), *Em/Nx* (K=0,81; p=0,006; N=11) y *Km/Nx* (K=0,81; p=0,006; N=11) en

*Paenibacillus*, *Tm/Vm* ( $K=0,86$ ;  $p<0,001$ ;  $N=22$ ) en *Pseudoalteromonas* y *Cc/Em* y *Rp/Tc* ( $K=0,82$ ;  $p=0,006$ ;  $N=11$ ) en *Pseudomonas*.

**Tabla 16.** Matriz de concordancia entre la resistencia simultánea a dos antibióticos. Antibióticos: *Cc*-Cloranfenicol, *Cz*-Ceftazidima, *Em*-Eritromicina, *Km*-Kanamicina, *Nx*-Ácido nalidíxico, *Rp*-Rifampicina, *Sm*-Streptomycin, *Tc*-Tetraciclina, *Tm*-Trimetoprima y *Vm*-Vancomicina.

	Total de aislados	<i>Altererythrobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Erythrobacter</i>	<i>Lutibacterium</i>	<i>Mesonnia</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Ponticaulis</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Cc/Em</i>															
<i>Cc/Km</i>															
<i>Cc/Nx</i>															
<i>Cc/Rp</i>															
<i>Cc/Tc</i>															
<i>Cc/Vm</i>															
<i>Cz/Km</i>															
<i>Cz/Nx</i>															
<i>Cz/Rp</i>															
<i>Cz/Sm</i>															
<i>Cz/Tm</i>															
<i>Cz/Vm</i>															
<i>Em/Km</i>															
<i>Em/Nx</i>															
<i>Em/Rp</i>															
<i>Em/Tc</i>															
<i>Em/Vm</i>															
<i>Km/Nx</i>															
<i>Km/Rp</i>															
<i>Km/Sm</i>															
<i>Km/Tc</i>															
<i>Km/Tm</i>															
<i>Km/Vm</i>															
<i>Nx/Sm</i>															
<i>Nx/Tc</i>															
<i>Nx/Tm</i>															
<i>Nx/Vm</i>															
<i>Rp/Tc</i>															
<i>Rp/Tm</i>															
<i>Rp/Vm</i>															
<i>Sm/Tc</i>															
<i>Sm/Tm</i>															
<i>Sm/Vm</i>															
<i>Tc/Tm</i>															
<i>Tc/Vm</i>															
<i>Tm/Vm</i>															

#### Escala de interpretación

Concordancias negativas				Concordancias positivas		
0,81-1	0,61-0,80	0,41-0,60	0,00-0,40	0,41-0,60	0,61-0,80	0,81-1
Muy Buena	Buena	Moderada	Débil o nula	Moderada	Buena	Muy Buena

## **4.2. Caracterización de las muestras de la Chorrera de Despeñalagua**

### **4.2.1. Parámetros fisicoquímicos**

Se analizaron muestras de dos zonas en el entorno de la Chorrera de Despeñalagua en la provincia de Guadalajara (G1 y G2). Solo se estudiaron muestras líquidas ya que prácticamente no existía sedimento en ninguna de las dos zonas de muestreo. Los parámetros fisicoquímicos mostraron algunas ligeras diferencias en el pH (G1: 6,10 y G2: 6,50), y en la temperatura (G1: 13°C y G2: 16°C) de ambas muestras. Las salinidades fueron parecidas en los dos puntos de muestreo (G1: 4 ‰ y G2: 5 ‰).

El análisis elemental semicuantitativo de las muestras por ICP-MS (tabla 17) muestra que los elementos mayoritarios en ambas muestras son B, Ba, Ca, K, Mg, Na y Sr. Se ha detectado también la presencia de Fe en la muestra G1 mientras que en la G2 está casi ausente. Por lo general, existe una cierta mayor concentración de los elementos alcalinos y alcalinotérreos como Ba, Ca, K, Mg y Na en la muestra G2. Las concentraciones del resto de los elementos no varían significativamente entre las dos zonas de muestreo.

### **4.2.2. Abundancia de bacterias totales y cultivables**

Para determinar la abundancia de bacterias presentes en las muestras, se realizaron recuentos de células al microscopio tras su tinción con DAPI, observándose valores de  $1,5 \times 10^6$  cél/mL en la muestra G1 y de  $2,8 \times 10^6$  cél/mL en la G2.

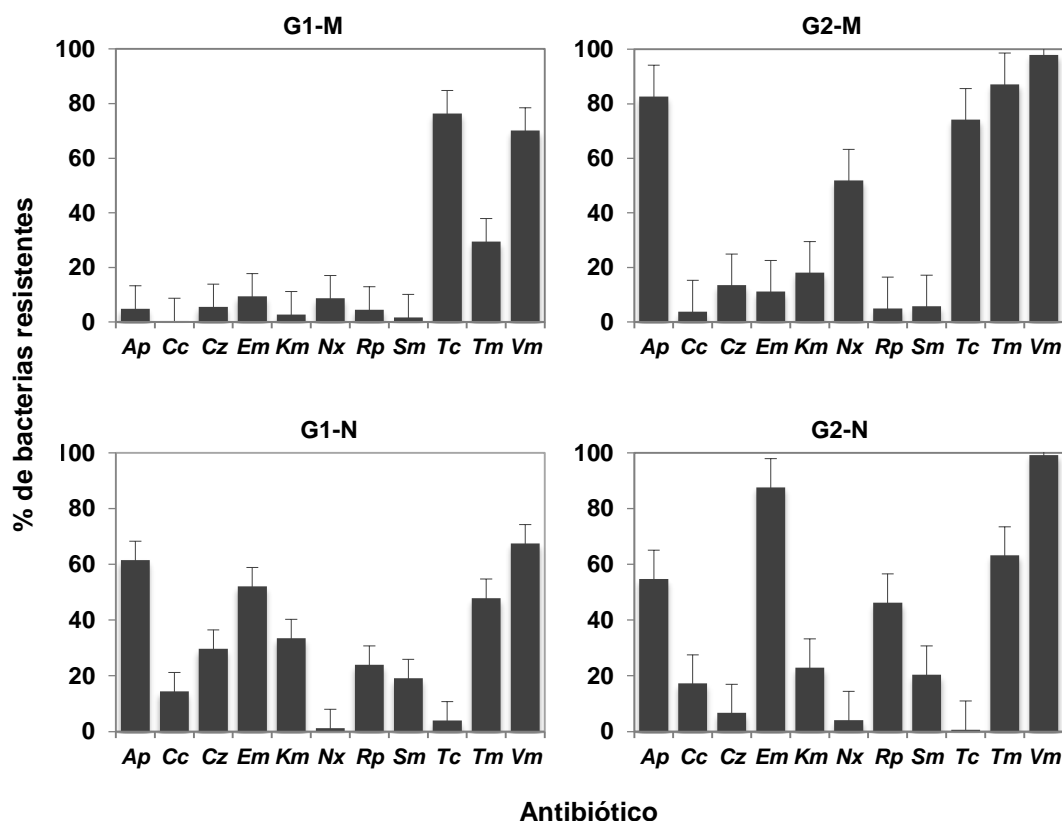
Las abundancias de bacterias cultivables, relativas al total de bacterias presentes, determinadas en el apartado anterior, fue de un 0,02% y un 0,01% para la muestra G1 y de un 0,03% y un 0,02% para la muestra G2, sobre medios sólidos nutritivo y marino respectivamente. Se detectó por lo tanto, una mayor abundancia relativa de bacterias cultivables en medio nutritivo que en medio marino en ambas muestras, siendo para ambos medios más abundantes las bacterias en la muestra G2 que en la G1.

**Tabla 17.** Análisis elemental semicuantitativo de las muestras G1 y G2.

	G1 (µg/L)	G2 (µg/L)
Au	0,564	0,295
B	39,868	17,646
Ba	2,049	4,028
Be	0,425	0,000
Bi	0,033	0,025
Ca	640,869	749,122
Co	0,108	0,000
Cr	0,000	0,279
Cu	0,197	0,132
Fe	2,544	0,311
K	40,162	126,632
Li	1,876	1,162
Lu	0,022	0,007
Mg	300,939	328,122
Mn	0,705	0,254
Na	498,509	523,984
Ni	1,302	1,142
Pb	0,687	0,690
Rb	0,041	0,042
Sr	3,554	2,891
Te	0,279	0,000
Th	0,743	0,162
U	0,646	0,000
V	0,068	0,000
W	0,395	0,104
Y	0,016	0,012

#### 4.2.3. Abundancia de bacterias resistentes a los antibióticos

La abundancia de bacterias resistentes a los diferentes antibióticos se expresó en porcentajes de resistentes sobre el total de cultivables (figura 14). Como se puede observar existen porcentajes elevados de bacterias resistentes a *Tm* o a *Vm* en ambas muestras y en los dos medios de cultivo empleados. El porcentaje de resistentes a *Tc* sobre el medio marino es muy elevado con respecto al observado sobre medio nutritivo. En cambio, ocurre al revés al considerar las resistentes a *Em*, que son más abundantes entre las cultivables en medio nutritivo. En la muestra G1 y sobre el medio marino, se detectaron niveles bajos de resistentes a antibióticos excepto para *Tc*, *Tm* y *Vm*.



**Figura 14.** Abundancia relativa de bacterias cultivables resistentes a antibióticos. Muestras de zonas G1 y G2, sobre medios de cultivo M: medio marino o N: medio nutritivo.

#### 4.2.4. Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a ampicilina

Al igual que para el caso del estudio de la ría de Huelva, se aislaron y caracterizaron las bacterias resistentes a ampicilina.

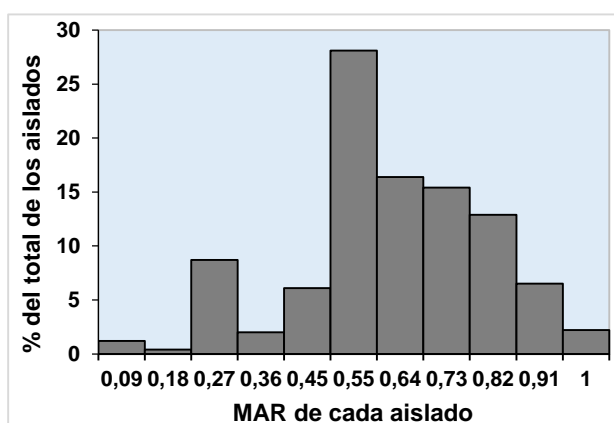
##### 4.2.4.1. Aislamiento de las bacterias

El aislamiento de las bacterias se realizó mediante pases sucesivos sobre medio de cultivo sólido con ampicilina. Se aislaron un total de 505 bacterias distribuidas por muestras y medios de cultivo de la siguiente forma: el 62,7% procedían de la zona de muestreo G2 y el 37,3% restante de la G1. Considerando ambas muestras, el mayor número de bacterias se aisló sobre medio nutritivo, 56,6%. Considerando independientemente el total de aislados de cada zona de muestreo, sobre medio marino se aisló un mayor porcentaje de bacterias de la muestra G2, 54,3%, que de la muestra G1, 25,0%.

#### 4.2.4.2. Distribución de los aislados según sus índices MAR y perfiles de multirresistencia

Estos perfiles se determinaron mediante la observación del crecimiento de los aislados en medios suplementados con los antibióticos correspondientes.

Solo un 0,4% de los aislados fue resistente a un solo antibiótico además de a *Ap*, mientras que a todos los antibióticos probados fueron resistentes un 2,2% del total de los aislados. La representación del porcentaje de aislados según sus MAR (figura 15), considerando todos los aislados obtenidos en la Chorrera de Despeñalagua, muestra una distribución asimétrica ligeramente negativa ( $g = -0,4$ ) de los valores, lo que significa que la distribución de los MAR está desplazada hacia valores por debajo de la mediana, que fue 0,636 (media 0,617).



**Figura 15.** Porcentajes de aislados según sus índices MAR.

Al igual que para los aislados de la ría de Huelva, se han calculado los parámetros estadísticos mediana, media aritmética y moda de los MARs, así como el porcentaje de aislados con valor de MAR superior a 0,5, es decir de aquellos que son resistentes a más del 50% (al menos a 6 de los 11) de los antibióticos usados (tabla 18). Los cálculos se han realizado considerando el total de aislados de la Chorrera de Despeñalagua (GT) y distintos subgrupos de aislados según la zona de muestreo de la que proceden (G1 y G2), los medios de aislamiento (GM y GN), y según ambos (G1-M, G1-N, G2-M y G2-N).

El valor de MAR más frecuentemente encontrado para un aislado (moda) supera el valor de 0,5 tanto si consideramos los aislados en su totalidad como en sus subgrupos siendo los más elevados correspondientes a los aislados considerados conjuntamente y obtenidos sobre medio marino (GM) y para el subgrupo G2-M. El valor de la moda para los aislados procedentes de la zona G1 en su conjunto fue superior al determinado para la zona G2. Se observaron valores de moda mayores para los subgrupos de los aislados obtenidos sobre el medio marino comparados con los del medio nutritivo ( $GM > GN$ ,  $G1-M > G1-N$  y  $G2-M > G2-N$ ). Comparando las zonas de muestreo y sus subgrupos en ambos medios se observa que la moda es mayor para la zona G1 que para la G2, pero para  $G2-M > G1-M$  y para  $G1-N > G2-N$ .

Como se observa en la tabla 18, si se consideran los aislados según los medios de cultivo de donde proceden, se observan valores de mediana mayores para los procedentes de medio marino que para los obtenidos sobre nutritivo ( $GM > GN$ ,  $G1-M > G1-N$  y  $G2-M > G2-N$ ). Comparando los valores de la mediana para las dos zonas de muestreo y teniendo en cuenta los medios de aislamiento, se aprecian diferencias reseñables entre los de las zonas G1 y G2 ( $G1 > G2$ ), iguales valores de mediana para los aislados en medio marino de una u otra zona ( $G1-M = G2-M$ ), pero un valor mayor para G1-N que para G2-N.

**Tabla 18.** Valores estadísticos de la distribución de los índices MAR de los aislados según su procedencia. Zonas de muestreo G1 y G2, GT grupo de todos los aislados de la Chorrera de Despeñalagua, M: medio marino, N: medio nutritivo.

	Mediana	Media	Moda	% MAR>0,5	N
<b>GT</b>	0.636	0.617	0.545	81.6	505
<b>GM</b>	0.727	0.726	0.818	94.1	219
<b>GN</b>	0.545	0.534	0.545	72.0	286
<b>G1</b>	0.636	0.607	0.636	82.4	188
<b>G2</b>	0.545	0.623	0.545	81.1	317
<b>G1-M</b>	0.727	0.720	0.727	97.9	47
<b>G2-M</b>	0.727	0.728	0.818	93.0	172
<b>G1-N</b>	0.636	0.570	0.636	77.3	141
<b>G2-N</b>	0.545	0.500	0.545	66.9	145

La comparación entre los valores de la media muestra el valor más bajo para G2-N y el más alto para GM y G2-M, observándose una diferencia



notable entre GM y GN ( $GM > GN$ ) y una ligera entre el conjunto de aislados de G2 con respecto a los de G1 ( $G1 < G2$ ). Dentro de cada zona de muestreo, los valores de la media fueron mayores para subgrupos sobre medio marino que para aquellos sobre nutritivo ( $G1-M > G1-N$  y  $G2-M > G2-N$ ) y entre los del mismo medio según la zona de muestreo fueron  $G1-N > G2-N$  con una diferencia muy pequeña entre G1-M y G2-M. A excepción del subgrupo de aislados de la zona G2 en su conjunto (mediana < media), todos los grupos analizados mostraron valores de mediana superiores o muy próximos a los valores de la media, indicando distribuciones con asimetría negativa o próximas a la normalidad.

Finalmente se encontraron un total de 92 perfiles diferentes de resistencia según las combinaciones de antibióticos a los que fueron resistentes. Los aislados de la muestra G1 se distribuyeron en 54 perfiles de resistencia, 42 entre los aislados sobre medio nutritivo y 13 entre los de medio marino. En los aislados procedentes de la muestra G2 se encontraron 62 perfiles, 26 entre los aislados en medio nutritivo y 37 entre los obtenidos en medio marino.

#### **4.2.4.3. Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según las zonas de muestreo y los medios de cultivo**

Se emplearon las mismas metodologías que en el caso de la ría de Huelva y se compararon los porcentajes de aislados resistentes a los distintos antibióticos en relación a la zona de muestreo de procedencia (tabla 19). Se observó que entre los aislados procedentes de las muestra G1 el porcentaje de resistentes a *Em*, *Sm* o *Vm* era superior al de los de la muestra G2 ( $p < 0,05$ ). En cambio, ocurrió lo contrario para los resistentes a *Nx*, *Tc* o *Tm* ( $p < 0,001$ ). No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de los resistentes a *Cc*, *Cz*, *Km* o *Rp* según la zona de muestreo.

En cuanto al medio de cultivo empleado en el aislamiento, se observó (tabla 20) que las bacterias aisladas sobre medio nutritivo presentaban un mayor porcentaje de resistentes a *Cc*, *Cz*, *Em* o *Sm* que

aquellas que crecieron sobre medio marino. Por el contrario, entre los aislados sobre medio marino era mayor el porcentaje de resistentes a *Km*, *Nx*, *Tc* o *Tm* que entre los procedentes de medio nutritivo. Ambas diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los dos medios de cultivos en el porcentaje de aislados resistentes a *Rp* o *Vm*.

**Tabla 19.** Porcentajes de aislados resistentes a los distintos antibióticos según las muestras. (\*) Diferencias significativas.

	G1 (%)	G2 (%)	$\chi^2$ Pearson	p
Cloranfenicol	58,0	56,2	0,161	0,689
Ceftazidima	50,0	53,0	0,425	0,515
Eritromicina	74,5	63,4	6,584	0,010*
Kanamicina	38,3	45,7	2,668	0,102
Ácido Nalidíxico	37,2	55,5	15,795	< 0,001*
Rifampicina	77,1	72,6	1,291	0,256
Estreptomina	20,7	10,4	10,310	0,001*
Tetraciclina	28,2	54,6	33,223	< 0,001*
Trimetoprima	88,8	97,2	14,659	< 0,001*
Vancomicina	95,2	77,3	28,159	< 0,001*

**Tabla 20.** Porcentajes de aislados resistentes a los antibióticos según los medios de cultivo. (\*) Diferencias significativas.

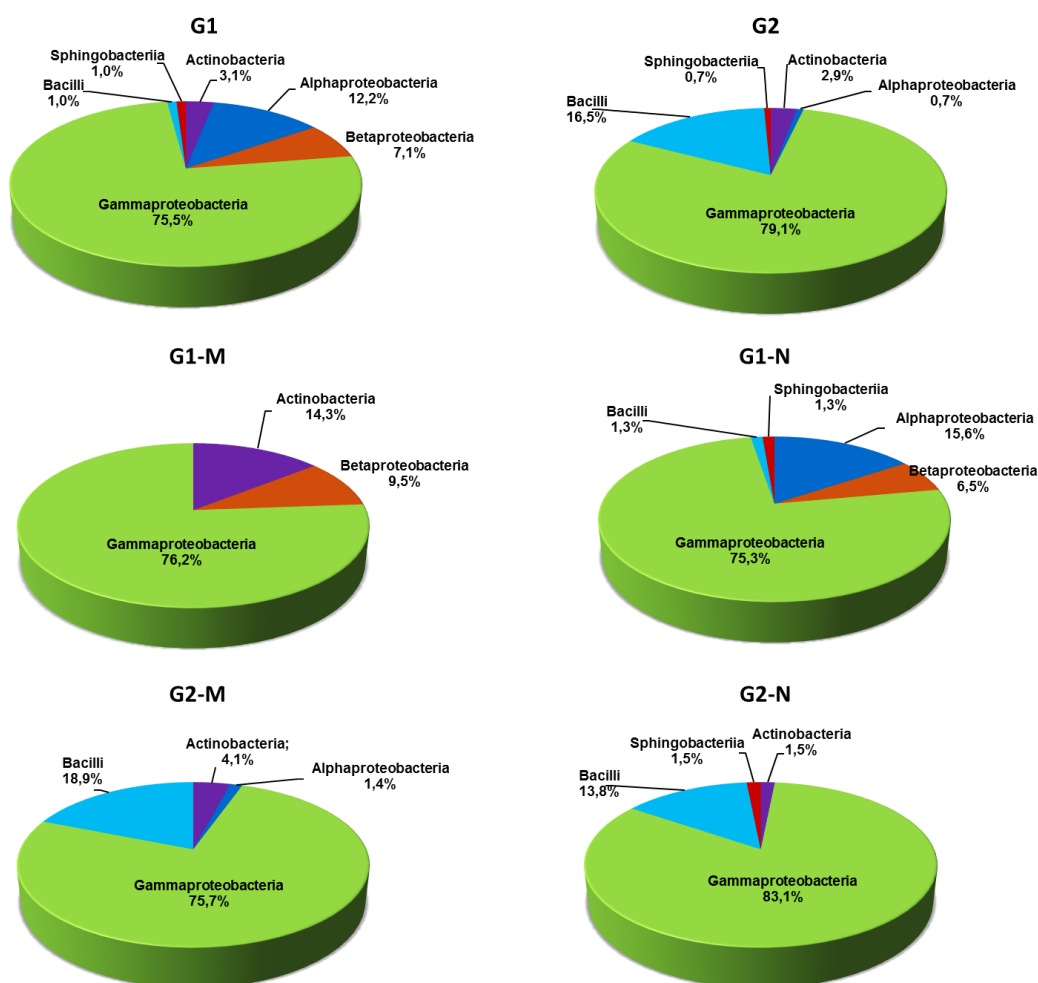
	Medio de cultivo		$\chi^2$ de Pearson	p
	Nutritivo (%)	Marino (%)		
Cloranfenicol	62,2	49,8	7,856	0,005*
Ceftazidima	56,3	46,1	5,144	0,023*
Eritromicina	75,5	57,1	19,246	< 0,001*
Kanamicina	11,5	84,0	265,879	< 0,001*
Ácido Nalidíxico	9,8	99,5	399,914	< 0,001*
Rifampicina	74,5	74,0	0,016	0,898
Estreptomina	17,5	10,0	5,611	0,018*
Tetraciclina	3,8	98,2	446,338	< 0,001*
Trimetoprima	90,2	99,1	17,491	< 0,001*
Vancomicina	86,4	80,8	2,828	0,093

#### 4.2.4.4. Asignación filogenética de aislados seleccionados

Siguiendo el mismo protocolo de selección de los aislados para su asignación filogenética realizado con el grupo de muestras procedentes de la ría de Huelva, se eligieron 237 aislados para la secuenciación y análisis de sus genes de ARNr 16S. En el caso de los aislados del género *Pseudomonas* adicionalmente se analizaron las secuencias del gen *rpoD*, que codifica para el factor  $\sigma 70$  de la ARN polimerasa.

#### 4.2.4.4.1. A niveles de clase y género

Los análisis de las secuencias obtenidas que se han realizado indican que los aislados de las muestras de la Chorrera de Despeñalagua se pueden englobar en 6 clases filogenéticas distribuyéndose según los porcentajes indicados: *Gammaproteobacteria* (77,6%), *Bacilli* (10,1%), *Alphaproteobacteria* (5,5%), *Actinobacteria* (3,0%), *Betaproteobacteria* (3,0%) y *Sphingobacteriia* (0,8%). Estas clases se reparten entre las zonas de muestreo y los medios de aislamiento como se puede ver en la figura 16.



**Figura 16.** Distribución por clases de las bacterias identificadas. **A:** según zonas de muestreo y **B:** según zona de muestreo y medio de aislamiento. Zonas de muestreo G1 y G2, M: medio marino y N: medio nutritivo.

Las gammaproteobacterias se presentaron en porcentajes similares de los aislados de cada zona de muestreo, aunque ligeramente mayores en el G2. Considerando los medios de aislamiento, las de G1 estaban representadas en porcentajes similares entre los aislados de ambos

medios, pero no así entre los de G2, entre los que el mayor porcentaje sobre el total de aislados en cada medio se observó sobre medio nutritivo. Por otro lado, los miembros del género *Bacillus*, que fue el único encontrado de la clase *Bacilli*, provenían en su mayoría de la muestra G2, distribuyéndose por igual entre los aislados obtenidos sobre los medios marino y nutritivo. Los aislados de las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, se encuentran representados mayoritariamente entre los de la muestra G1 y se aislaron, los primeros en mayor porcentaje entre los obtenidos sobre medio nutritivo, y los segundos entre los obtenidos en ambos medios con porcentajes similares, si bien algo mayor entre los de medio marino. No se aislaron miembros de la clase *Betaproteobacteria* a partir de la muestra G2. Las *actinobacterias* se aislaron principalmente sobre medio marino, siendo porcentualmente más abundantes entre los aislados de la muestra G1. Miembros de la clase *Sphingobacteriia* sólo aparecieron entre los aislados en medio nutritivo y estaban distribuidos porcentualmente de forma parecida entre los aislados procedentes de una u otra zona de muestreo.

Los aislados identificados se agrupan en 20 géneros diferentes, de los cuales la mayor diversidad se encuentra en la clase *Gammaproteobacteria* con un total de 8 (tabla 21). Por el contrario, las clases *Bacilli* y *Sphingobacteriia* solo están representadas por un género cada una. El 40,0% de los géneros detectados solo se encontraron en la muestra G1, el 20,0% son exclusivos de la G2 y el 40,0% restante son comunes a las dos zonas de muestreo.

Todos los aislados analizados se han identificado a nivel de género, representando *Pseudomonas*, *Serratia* y *Herbaspirillum* porcentajes de 43,8%, 12,5% y 6,3% del total de aislados respectivamente. El porcentaje de cada una de los géneros restantes es de 3,1% al haberse encontrado en solo una ocasión cada uno de ellos.

**Tabla 21.** Distribución de los aislados según los géneros detectados en cada clase. Las celdas de color verde indican la presencia del género indicado en las zonas de muestreo, G1 y G2, y según el medio de aislamiento empleado, M: medio marino y N: medio nutritivo.

Clase	Género (% en la clase)	G1-M	G2-M	G1-N	G2-N
<b>Actinobacteria</b>	<i>Knoellia</i> (42,9%)				
	<i>Microbacterium</i> (28,6%)				
	<i>Plantibacter</i> (14,29%)				
	<i>Rhodococcus</i> (14,3%)				
<b>Alphaproteobacteria</b>	<i>Phyllobacterium</i> (69,2%)				
	<i>Rhizobium</i> (30,8%)				
<b>Bacilli</b>	<i>Bacillus</i> (100,0%)				
<b>Betaproteobacteria</b>	<i>Chromobacterium</i> (14,3%)				
	<i>Curvibacter</i> (14,3%)				
	<i>Herbaspirillum</i> (57,1%)				
	<i>Neisseria</i> (14,3%)				
<b>Gammaproteobacteria</b>	<i>Aeromonas</i> (8,7%)				
	<i>Budvicia</i> (1,1%)				
	<i>Enterobacter</i> (0,5%)				
	<i>Klebsiella</i> (0,5%)				
	<i>Pseudomonas</i> (65,8%)				
	<i>Rahnella</i> (4,4%)				
	<i>Serratia</i> (16,9%)				
	<i>Stenotrophomonas</i> (2,2%)				
<b>Sphingobacteria</b>	<i>Sphingobacterium</i> (100,0%)				

#### 4.2.4.4.2. A nivel de especie

Al analizar las secuencias de ARNr 16S obtenidas para los distintos aislados nos encontramos una situación similar a la observada para los aislados de la ría de Huelva en cuanto a la similitud de las secuencias de los aislados y las de la base de datos, adoptándose por ello el mismo criterio para la caracterización a nivel de especie de los aislados procedentes de la Chorrera de Despeñalagua. Los resultados de este análisis se recogen en la tabla 22, en la que se muestra la proximidad filogenética de 140 aislados a 35 especies concretas y de 6 aislados a 3 parejas de dos especies posibles, resultando infructuosa la determinación de una especie única filogenéticamente próxima para el resto de los aislados. En la tabla también se indica el número de variantes de secuencia (genomovares) encontradas en los aislados estudiados.

## Resultados

**Tabla 22.** Especies filogenéticamente más próximas a los aislados en base a la secuencia de sus ARNr 16S y su distribución según muestras y medios de aislamiento. N° ais.: número de aislados; N° gv.: número de secuencias diferentes encontradas.

Especie	Máx. % ident.	N° acceso secuencias máxima identidad	N° ais.	N° gv.	N°aislados (n°genomovares)			
					G1-M	G2-M	G1-N	G2-N
<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	KT215607, KP822822	2	1			1(1)	1(1)
<i>Aeromonas popofii</i>	99-100	JQ795758, JF915309, JX860592	7	3			6(3)	1(1)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	99-100	KM117163, KT215606	5	2	1(1)	1(1)	3(2)	
<i>Aeromonas</i> sp.	100		2	1			1(1)	1(1)
<i>Budvicia aquatica</i>	99	NR_025332	2	1			2(1)	
<i>Bacillus simplex</i>	100	KM817232, KJ721216	4	1		4(1)		
<i>Bacillus</i> sp.	100		20	3		10(3)	1(1)	9(3)
<i>Chromobacterium haemolyticum</i>	100	KJ845679	1	1	1(1)			
<i>Curvibacter delicatus</i>	98	NR_113696	1	1			1(1)	
<i>Enterobacter</i> sp.	100		1	1				1(1)
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	99	KM187634, KJ186942	3	3			3(3)	
<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i>	99	NR_043621	1	1	1(1)			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	KC456572	1	1				1(1)
<i>Knoellia sinensis</i>	99	AY167851	1	1		1(1)		
<i>Knoellia locipacati</i>	100	NR_109064	2	1		2(1)		
<i>Microbacterium</i> sp.	100		2	1	2(1)			
<i>Neisseria</i> sp.	100	KC337259	1	1			1(1)	
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	100	EU420077	9	1		1(1)	8(1)	
<i>Plantibacter flavus/cousinae</i>	99	KR055024/ JX133202	1	1	1(1)			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	FJ620575	4	1				4(1)
<i>Pseudomonas baetica</i>	99	KC790260	1	1			1(1)	
<i>Pseudomonas baetica/koreensis</i>	99	KF580860/ JQ782511	1	1			1(1)	
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	99-100	KR054984, LC015570	3	2		2(1)	1(1)	
<i>Pseudomonas brenneri</i>	99	KF040473, JX417433	3	2		2(1)		1(1)
<i>Pseudomonas corrugata</i>	99-100	KM658326	6	3		6(3)		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99-100	AB680969, KT215474, KT215487, KM411503, GU198123	8	5		4(3)	3(3)	1(1)
<i>Pseudomonas fluorescens/gessardii</i>	100	KJ919971/ KJ726601	1	1				1(1)
<i>Pseudomonas fluorescens/veronii</i>	100	DQ178231/ AY081814	1	1		1(1)		
<i>Pseudomonas fragi</i>	99-100	AB680221, AB685627, AB685617, JX262396, KJ909019	6	4			5(3)	1(1)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis/ficuserectae</i>	100	KF424300/ KF424299	1	1			1(1)	
<i>Pseudomonas koreensis</i>	100	KJ608427	1	1		1(1)		
<i>Pseudomonas orientalis</i>	100	HQ825051	1	1			1(1)	
<i>Pseudomonas protegens</i>	99	JX082197	4	1		2(1)	2(1)	
<i>Pseudomonas putida</i>	100	AY918068	1	1		1(1)		
<i>Pseudomonas reinekei</i>	99-100	KC790314, KJ589479	10	3	1(1)	7(2)		2(1)
<i>Pseudomonas saponiphila</i>	100	JN033556	1	1				1(1)
<i>Pseudomonas</i> sp.	99-100		58	19	3(3)	14(7)	14(10)	27(7)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	99	AF320989, EU169178	9	2	2(1)	6(2)	1(1)	
<i>Pseudomonas veronii</i>	99-100	KJ726603, HQ824919	6	1			4(1)	2(1)
<i>Rahnella aquatilis</i>	99-100	KF317871, JX867757, LK391526, KJ563269, KJ939705	5	5	3(3)	1(1)	1(1)	
<i>Rahnella</i> sp.	99-100		3	3	2(2)			1(1)
<i>Rhizobium leucaenae/tropici</i>	100	JF318176, HM852122	4	1			4(1)	
<i>Rhodococcus</i> sp.	100		1	1				1(1)
<i>Serratia fonticola</i>	99-100	JN596121, CP011254, AY236502, NR_116808	25	10	3(3)	6(2)	9(6)	7(3)
<i>Serratia marcescens</i>	100	KR262852, KJ721215, KJ672309	3	2		2(2)		1(1)
<i>Serratia plymuthica</i>	100	KR054980	1	1			1(1)	
<i>Serratia</i> sp.	99-100		2	2	1(1)	1(1)		
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	100	NR_041636	2	1			1(1)	1(1)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	KR083021, KF818624	2	2		1(1)		1(1)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100	KR055001	2	1			2(1)	

Los aislados del género *Pseudomonas* para los que no se pudo diferenciar a nivel de especie utilizando las secuencias obtenidas del ARNr 16S, se analizaron utilizando el gen *rpoD*. Para ello, este gen fue amplificado y secuenciado para los distintos aislados y las secuencias obtenidas comparadas con las existentes en GenBank para especies determinadas. Como se puede observar (tabla 23) los resultados obtenidos han permitido indicar las especies concretas más próximas a 23 de los aislados del género *Pseudomonas* no asignados previamente, y que se distribuyeron entre 4 especies. El porcentaje máximo de identidad fue en algunos casos relativamente bajo, indicando que no existen en la base de datos secuencias de mayor similitud, bien porque las de los aislados en esa situación correspondan a especies no descritas o más probablemente a que no se ha descrito la secuencia del gen analizado para las especies a las que pertenecerían los aislados. Dos de los aislados adscritos a dos posibles especies distintas según el análisis de la secuencia de sus ARNr 16S, fueron asignados ahora a una sola especie cada uno.

**Tabla 23.** Especies filogenéticamente más próximas a los aislados en base a la secuencia del gen *rpoD* y su distribución según muestras y medios de aislamiento. N° ais.: número de aislados; N° gv.: número de genomovares encontrados.

Especie	Máx. % ident.	N° acceso secuencias máxima identidad	N° ais.	N° gv.	N°aislados (n°genomovares)			
					G1-N	G1-M	G2-N	G2-M
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	94-97	AB039535, CP000094, HE586448	12	10	4(3)		6(5)	2(2)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	95	AM084335	1	1				1(1)
<i>Pseudomonas koreensis</i>	95-99	FN554476	7	3	1(1)		6(2)	
<i>Pseudomonas salomonii</i>	95-99	FN554512	4	4	2(2)	1(1)		1(1)
<i>Pseudomonas trivialis</i>	99	CP011507	1	1		1(1)		

#### 4.2.4.4.2.1. Índices de biodiversidad a nivel de especie

Para determinar si había alguna diferencia en los niveles de biodiversidad a nivel de especie de las bacterias aisladas e identificadas en cada muestra, se calcularon los correspondientes índices de biodiversidad de Margalef ( $D_{Mg}$ ), Simpson ( $\lambda$ ) y Shannon-Wiener ( $H'$ ) (tabla 24). Considerando las muestras en su conjunto, los valores de los índices  $D_{Mg}$ ,  $\lambda$  y  $H'$  resultaron ser de 6,92, 0,94 (máx. 1) y 3,15 (máx. 5) respectivamente, indicando una considerable diversidad de bacterias resistentes a *Ap* en el sistema biológico de la Chorrera de Despeñalagua correspondiente a las

zonas de muestreo elegidas. Al comparar entre sí ambas zonas de muestreo, se observaron valores de estos índices solo ligeramente superiores para la muestra de la zona G1 que para la de la G2, indicando por tanto una biodiversidad similar para ambas zonas de muestreo, aunque algo mayor entre los aislados identificados de la zona G1. También se observaron índices de biodiversidad similares cuando se consideraron los aislados totales según el medio de cultivo, mostrándose valores ligeramente superiores para los aislados en medio nutritivo que para los del medio marino (GN>GM). Agrupando los aislados de cada zona de muestreo según el medio de cultivo se obtuvieron unos valores de los índices superiores para los aislados de G1 en medio nutritivo que en medio marino (G1-N>G1-M), mostrando una mayor diversidad de los aislados sobre medio nutritivo. Para la muestra G2 se observaron diferencias algo menores en los índices según el medio, con valores ligeramente más elevados para los aislados en el medio marino (G2-M>G2-N).

**Tabla 24.** Índices de biodiversidad a nivel de especie de los aislados según las zonas de muestreo y los medios de cultivo. **D<sub>Mg</sub>**: índice de Margalef, **λ**: índice de Simpson y **H'**: índice de Shannon-Wiener, Zonas de muestreo: G1 y G2, G: muestra total, M: medio marino, N: medio nutritivo.

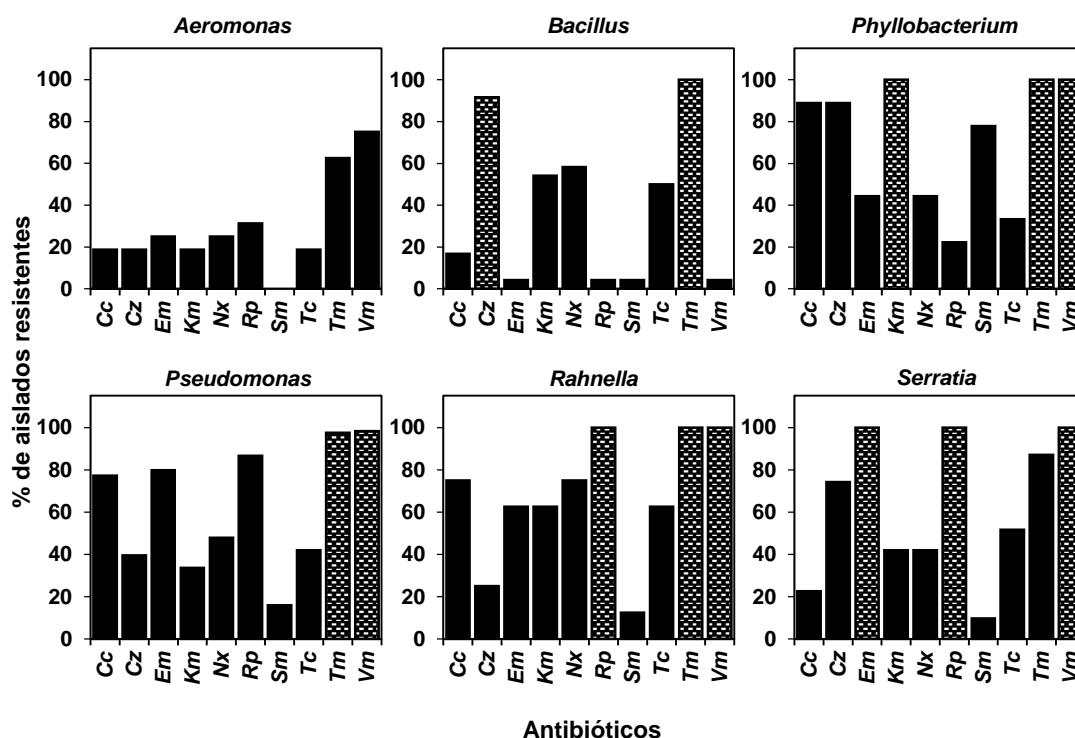
	<b>D<sub>Mg</sub></b>	<b>λ</b>	<b>H'</b>
<b>GT</b>	6,92	0,94	3,15
<b>G1</b>	5,81	0,93	2,92
<b>G2</b>	5,19	0,92	2,80
<b>GM</b>	4,57	0,92	2,7
<b>GN</b>	6,20	0,92	2,9
<b>G1-M</b>	2,73	0,84	1,95
<b>G1-N</b>	5,11	0,92	2,77
<b>G2-M</b>	4,02	0,91	2,60
<b>G2-N</b>	3,79	0,87	2,30

#### 4.2.4.5. Prevalencia de los aislados resistentes a los antibióticos según los géneros a los que pertenecen

Se analizó la prevalencia de los aislados de cada género que eran resistentes a cada antibiótico para determinar los géneros que probablemente podrían ser resistentes intrínsecos, siguiendo para ello el mismo criterio utilizado para los aislados procedentes de la ría de Huelva (véase apartado 4.1.4.5). Como se puede observar (figura 17), a excepción de los antibióticos Cc, Nx, Sm y Tc, la resistencia a cada uno de los



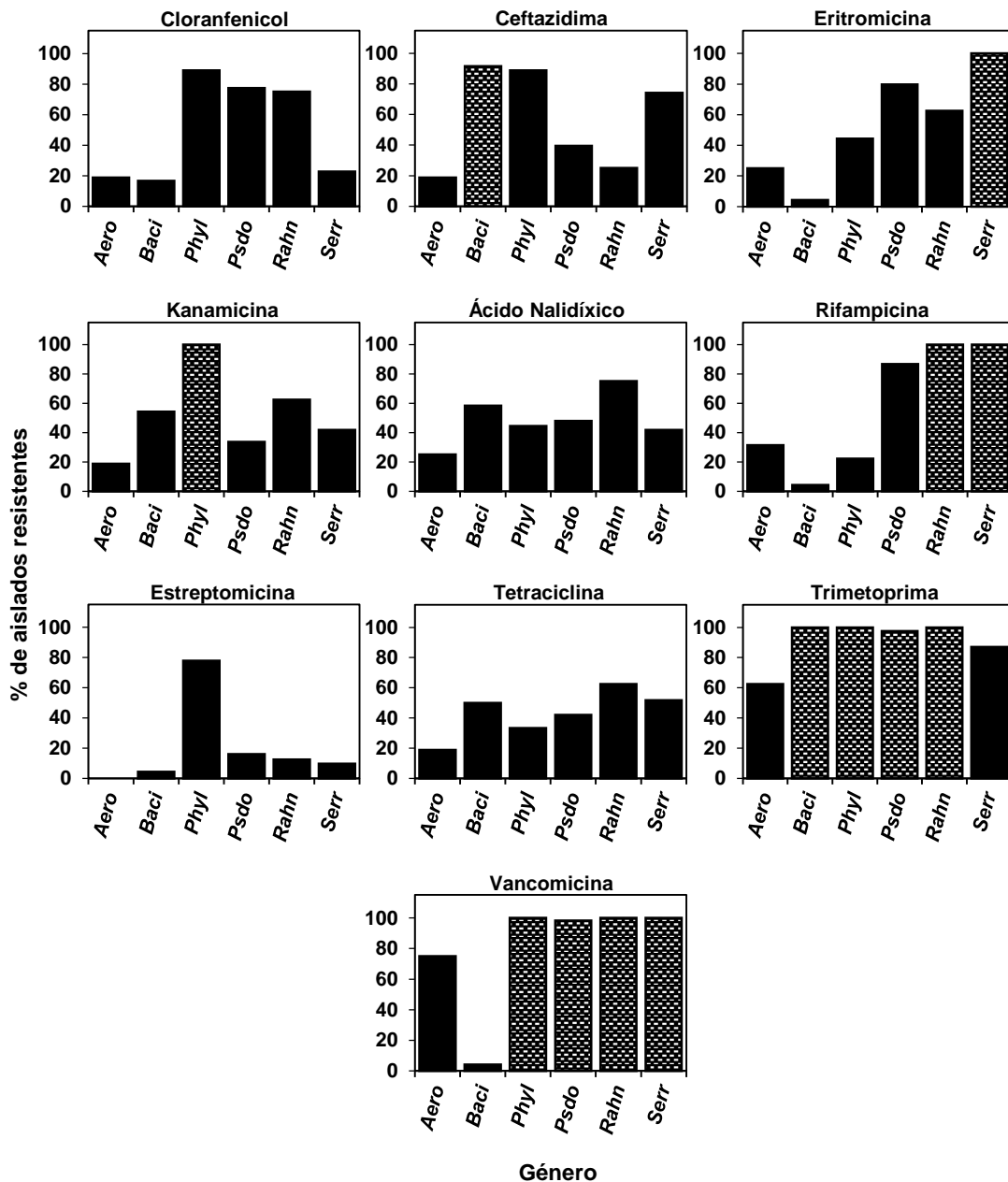
antibióticos estudiados, podría ser intrínseca en al menos uno de los géneros identificados. Se detectaron géneros resistentes posiblemente intrínsecos a 2 antibióticos como *Bacillus* a Cz y Tm, y *Pseudomonas* a Tm y Vm, o a 3 antibióticos como *Phyllobacterium* a Km, Tm y Vm, *Rahnella* a Rp, Tm y Vm y *Serratia* a Em, Rp y Vm. Para el género *Aeromonas* no se detectó ninguna posible resistencia intrínseca. En la mayoría de los casos, dentro de cada género se encontraron aislados sensibles a los antibióticos empleados y en un caso, en el género *Aeromonas*, todos lo fueron a Sm.



**Figura 17.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos en los géneros indicados. Antibióticos: Cc-Cloranfenicol, Cz-Ceftazidima, Em-Eritromicina, Km-Kanamicina, Nx-Ácido nalidíxico, Rp-Rifampicina, Sm-Estreptomicina, Tc-Tetraciclina, Tm Trimetoprima y Vm-Vancomicina. ■— indica porcentajes  $\geq 90,0$ .

Si comparamos los porcentaje de aislados de cada género que son resistentes a cada uno de los distintos antibióticos utilizados (figura 18), observamos que los que mostraron mayor abundancia relativa de resistentes según el antibiótico, y excluyendo los géneros que se han considerado resistentes intrínsecos a antibióticos concretos, fueron: para Cc, Cz, y Sm *Phyllobacterium*, para Em y Rp *Pseudomonas*, para Km, Nx y Tc *Rahnella*, para Tm *Serratia* y para Vm *Aeromonas*. Por el contrario los géneros con mayores porcentajes de aislados sensibles fueron según el antibiótico, para Cz, Km, Nx, Sm y Tc *Aeromonas*, y para Cc, Em, Rp, Sm y

*Vm Bacillus*. Para *Tm* todos los géneros analizados mostraron porcentajes de aislados resistentes superiores al 60,0%.



**Figura 18.** Abundancia relativa de los aislados resistentes a los antibióticos según el género. al que pertenecen. Géneros: Aero.: *Aeromonas*, Baci.: *Bacillus*, Phyl.: *Phyllobacterium*, Psdo.: *Pseudomonas*, Rahn.: *Rahnella*, Serr.: *Serratia*. ■- indica porcentajes  $\geq$  a 90,0.

Excluyendo los antibióticos a los que algún género se muestra intrínsecamente resistente, algunos antibióticos son también capaces de inhibir el crecimiento de un bajo número de aislados de cada uno de los géneros restantes, como es el caso de *Tm* con una media de  $74,8 \pm 17,4\%$  (87,1-62,5%, N=2). En el caso de *Vm* ( $75,0 \pm 4,2\%$ , N=2,  $\bar{x} = 39,6 \pm 50,1\%$ ),

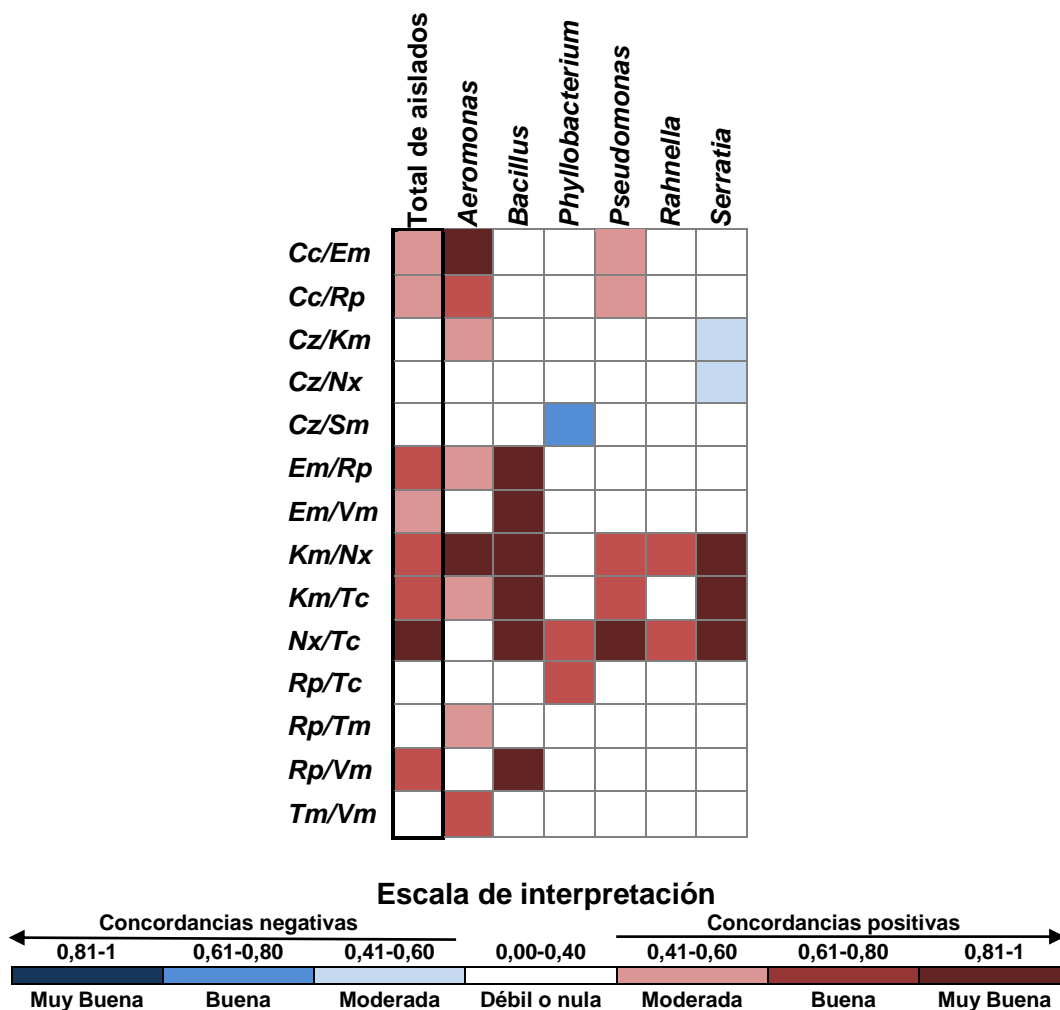
mientras que 4 de los 6 géneros analizados presentan un elevado porcentaje de resistentes a este antibiótico, los aislados del género *Bacillus* fueron mayoritariamente sensibles. Los aislados resistentes a *Sm* (77,8-0,0%, N=6,  $\bar{x}=20,0\pm28,9\%$ ) aparecieron generalmente en bajo porcentaje con la excepción del género *Phyllobacterium*, en el que aparecieron de forma abundante, aunque no suficiente para ser considerada una resistencia intrínseca según los criterios que hemos considerado. No se detectaron géneros con resistencias intrínsecas a los antibióticos *Cc* (88,9-16,7%, N=6,  $\bar{x}=49,9\pm33,8\%$ ), *Nx* (75,0-25,0%, N=6,  $\bar{x}=48,8\pm16,8\%$ ), *Sm* (77,8-0,0%, N=6,  $\bar{x}=20,0\pm28,9\%$ ) o *Tc* (62,5-18,8%, N=6,  $\bar{x}=43,0\pm15,4\%$ ). Teniendo esto en cuenta, y excluyendo los aislados de los géneros intrínsecamente resistentes, podemos decir que, de mayor a menor, los porcentajes de resistentes a cada antibiótico, con respecto al total de aislados no intrínsecamente resistentes, en el sistema biológico de la Chorrera de Despeñalagua determinarían una abundancia de resistentes que seguiría el siguiente orden:  $Tm > Cc > Cz > Nx > Em > Tc > Km > Vm > Rp > Sm$ .

#### 4.2.4.6. Análisis de la asociación de las resistencias a dos antibióticos

De la misma forma que se hizo para los aislados de la ría de Huelva, se ha empleado el coeficiente Kappa (**K**) (Alman 1991) para analizar la probabilidad de fenómenos de co-resistencia a dos antibióticos simultáneamente.

Según se desprende de estos valores (tabla 25), para todos los aislados en su conjunto, la concordancia más alta (muy buena) se encontró para la pareja *Nx/Tc* ( $K=0,87$ ;  $p<0,001$ ; N=505) seguido de las siguientes combinaciones con concordancia buena: *Km/Tc* ( $K=0,75$ ;  $p<0,001$ ; N=505), *Km/Nx* ( $K=0,70$ ;  $p<0,001$ ; N=505), *Rp/Vm* ( $K=0,68$ ;  $p<0,001$ ; N=505) y *Em/Rp* ( $K=0,62$ ;  $p<0,001$ ; N=505). Las parejas de antibióticos con una concordancia moderada fueron: *Em/Vm* ( $K=0,55$ ;  $p<0,001$ ; N=505), *Cc/Em* ( $K=0,48$ ;  $p<0,001$ ; N=505) y *Cc/Rp* ( $K=0,46$ ;  $p<0,001$ ; N=505). Los niveles de concordancia para el resto de las parejas fueron débiles o nulos.

**Tabla 25.** Matriz de concordancia entre la resistencia simultánea a dos antibióticos. *Cc*-Cloranfenicol, *Cz*-Ceftazidima, *Em*-Eritromicina, *Km*-Kanamicina, *Nx*-Ácido nalidíxico, *Rp*-Rifampicina, *Sm*-Estreptomina, *Tc*-Tetraciclina, *Tm*-Trimetoprima y *Vm*-Vancomicina.



También se calculó el parámetro de concordancia Kappa para los 6 géneros con mayor número de aislados siguiendo el mismo criterio utilizado para el estudio de la ría de Huelva, géneros con 8 o más aislados. Los resultados (tabla 25) muestran concordancias de nivel igual o superior a mediano para todos los géneros. El género con mayor número de concordancias fue *Aeromonas* con 2 muy buenas: *Cc/Em* y *Km/Nx* ( $K=0,82$ ;  $p=0,001$ ;  $N=16$ ), 2 buenas: *Tm/Vm* ( $K=0,71$ ;  $p=0,003$ ;  $N=16$ ) y *Cc/Rp* ( $K=0,67$ ;  $p=0,004$ ;  $N=16$ ) y 4 moderadas: *Km/Tc* ( $K=0,60$ ;  $p=0,018$ ;  $N=16$ ), *Cz/Km* ( $K=0,59$ ;  $p=0,018$ ;  $N=16$ ), *Em/Rp* ( $K=0,54$ ;  $p=0,029$ ;  $N=16$ ) y *Rp/Tm* ( $K=0,45$ ;  $p=0,037$ ;  $N=16$ ). Todas las concordancias encontradas en el género *Bacillus* fueron de nivel muy bueno: *Em/Rp*, *Em/Vm* y *Rp/Vm* ( $K=1,00$ ;  $p<0,001$ ;  $N=24$ ), *Km/Nx* y *Km/Tc* ( $K=0,92$ ;  $p<0,001$ ;  $N=24$ ) y *Nx/Tc*

( $K=0,83$ ;  $p<0,001$ ;  $N=24$ ). Para *Pseudomonas* solo una concordancia fue muy buena  $Nx/Tc$  ( $K=0,85$ ;  $p<0,001$ ;  $N=121$ ). El caso de *Serratia* las concordancias positivas fueron muy buenas para las parejas:  $Km/Nx$  ( $K=0,87$ ;  $p<0,001$ ;  $N=31$ ),  $Km/Tc$  y  $Nx/Tc$  ( $K=0,81$ ;  $p<0,001$ ;  $N=31$ ). El género con menor número de concordancias fue *Rahnella* con 2 de nivel bueno:  $Km/Nx$  y  $Nx/Tc$  ( $K=0,71$ ;  $p=0,035$ ;  $N=8$ ). Dos géneros mostraron algunas concordancias negativas, de nivel bueno en el género *Phyllobacterium* para  $Cz/Sm$  ( $K=-0,61$ ;  $p=0,047$ ;  $N=9$ ) y dos de nivel moderado en el género *Serratia* para  $Cz/Km$  y  $Cz/Nx$  ( $K=-0,44$ ;  $p=0,002$ ;  $N=31$ ). Cabe destacar la existencia de una concordancia buena o muy buena entre las parejas  $Nx/Tc$  y  $Km/Nx$  en 5 de los 6 géneros analizados.

### **4.3. Estudio de la resistencia a ertapenem de las bacterias aisladas**

Habiéndose obtenido y caracterizado en este trabajo bacterias resistentes a un betalactámico como la ampicilina que se comercializa desde hace ya tiempo y siendo esta familia de antibióticos una sobre la que un mayor incremento de la resistencia se ha observado en los últimos años, incluso a los miembros de esta familia más modernos, hemos estudiado la capacidad de estos aislados de resistir a una carbapenema, el ertapenem, con los resultados que a continuación se exponen.

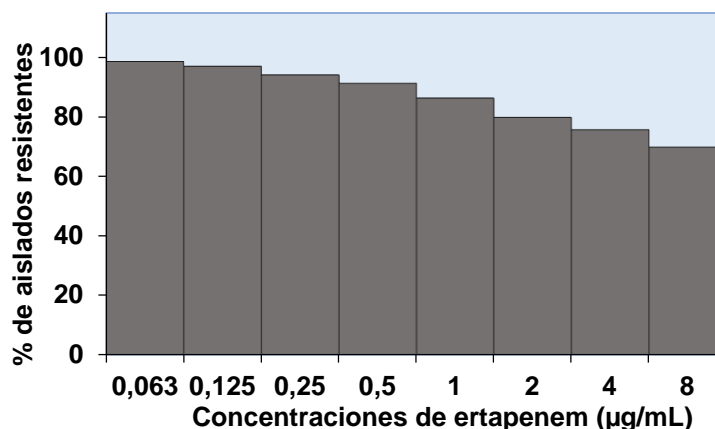
#### **4.3.1. Aislados procedentes de la ría de Huelva**

##### **4.3.1.1. Prevalencia de los aislados resistentes a distintas concentraciones del antibiótico**

Se determinó la resistencia a diferentes concentraciones de *Ep* de 557 aislados de la ría de Huelva, siguiendo el protocolo establecido durante la caracterización de la multirresistencia a los antibióticos de uso común. Algunos de los aislados originalmente obtenidos no sobrevivieron al protocolo de conservación utilizado y no pudieron ser utilizados para este estudio.

Los resultados obtenidos (figura 19) mostraron que, considerando todos los aislados conjuntamente, un 98,4% de los aislados fueron

resistentes a una concentración de 0,063 µg/mL mientras que un 69,8% lo fueron a la concentración más alta utilizada, 8 µg/mL.



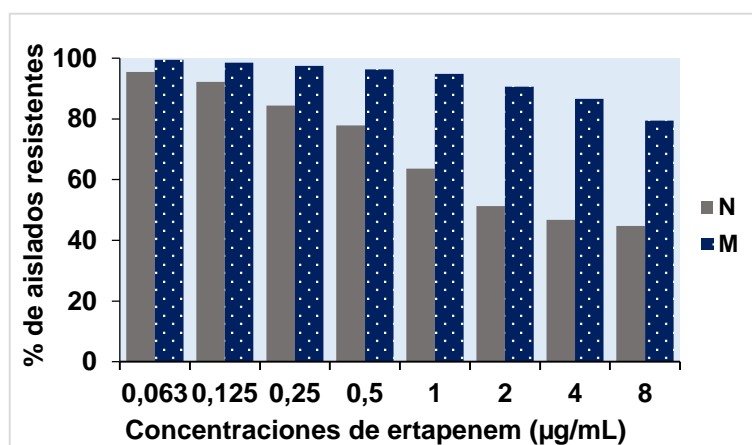
**Figura 19.** Porcentajes de aislados resistentes a distintas concentraciones de ertapenem.

Según se desprende de los porcentajes de aislados resistentes a *Ep* procedentes de las distintas muestras (tabla 26) no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los aislados según su procedencia para las concentraciones 0,063 y 0,125 µg/mL cuando se analizaron todas las muestras conjuntamente. Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de porcentajes de resistentes entre los aislados de las fases líquidas de ambas zonas de muestreo (H1L y H2L). Sin embargo, en los aislados procedentes de los sedimentos (H1S y H2S) se determinaron porcentajes de resistentes que, de una forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), mostraban ser mayores para H2S, en casi todas las concentraciones probadas del antibiótico. Entre los aislados procedentes de la zona H1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los procedentes de una u otra fase (H1L y H1S) a las concentraciones de 0,063-1 µg/mL. Para concentraciones de 2 µg/mL o superiores el porcentaje de aislados resistentes a *Ep* procedentes de la fase líquida fue superior al observado para los procedentes del sedimento, con significación estadística ( $p < 0,05$ ). Los aislados procedentes de una u otra fase de la zona H2 (H2L y H2S) presentaron unos porcentajes de resistentes significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ), siendo mayor para los obtenidos del sedimento, a las concentraciones de 4 y 8 µg/mL.

**Tabla 26.** Porcentajes de aislados resistentes a distintas concentraciones de ertapenem según las muestras de las que proceden. (\*) Diferencias estadísticamente significativas.

Concentración de <i>Ep</i> (µg/mL)	% de los aislados				$\chi^2$ de Pearson	p
	H1L	H2L	H1S	H2S		
0,063	98,9	98,9	95,9	99,0	4,661	0,198
0,125	97,2	97,2	92,8	99,0	6,844	0,077
0,25	92,6	96,1	88,7	97,1	8,567	0,036*
0,5	89,8	93,3	84,5	96,2	10,018	0,018*
1,0	85,2	90,6	72,2	93,3	23,408	<0,001*
2,0	79,5	83,9	59,8	91,3	34,446	<0,001*
4,0	75,6	77,2	55,7	91,3	35,106	<0,001*
8,0	69,3	68,9	53,6	87,5	27,631	<0,001*

En cuanto al medio de cultivo empleado para el aislamiento (figura 20), se observó que en todas las concentraciones el porcentaje de bacterias resistentes a *Ep* entre las que habían sido aisladas sobre medio marino es superior que el de aquellas que crecieron sobre medio nutritivo, ( $p < 0,01$ ).



**Figura 20.** Porcentaje de bacterias resistentes a diferentes concentraciones de ertapenem según el medio de cultivo. M: medio marino, N: medio nutritivo.

#### 4.3.1.2. Distribución de los aislados *Ep* según su procedencia, medios de aislamiento y géneros a los que pertenecen

Se decidió considerar como bacterias resistentes a *Ep* aquellas que mostrasen crecimiento sobre concentraciones de 2 µg/mL. De esta forma y considerando los aislados disponibles (tabla 27), el porcentaje de resistentes según muestra y medio indica un mayor valor para los aislados de medio marino (HM) que para los que se habían aislado en medio nutritivo (HN). La procedencia de las muestras también afectaba al porcentaje de resistentes observado de forma que su valor fue mayor para

los procedentes de la zona H2 que para los de la zona H1. El porcentaje de resistentes entre los aislados de la fase líquida de la zona H1 (H1L) fue significativamente superior al encontrado entre los del sedimento de la misma zona (H1S), pero similar al de la misma fase de la zona H2 (H2L). Sin embargo éste fue inferior al observado para el sedimento de la misma zona (H2S). Entre los aislados procedentes de los sedimentos, se observaron porcentajes superiores entre los de la zona H2 (H2S) que entre los de la zona H1 (H1S). Analizando los porcentajes de aislados resistentes a esta concentración de *Ep* según las muestras de procedencia y medios de aislamiento, se observa que es mayor entre los obtenidos sobre medio marino que entre los de medio nutritivo, considerados globalmente (HM>HN), por muestra (H2>H1) o según la fase de cada zona de muestreo (H1L-M>H1L-N, H2L-M>H2L-N, H1S-M>H1S-N, H2S-M>H2S-N) y de forma estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ) excepto para H2S ( $p=0,117$ ). Comparando grupos de aislados equivalentes en las dos zonas de muestreo resulta que los porcentajes de aislados resistentes son muy parecidos entre sí si se consideran los obtenidos sobre medio marino, difiriendo notablemente entre los de medio nutritivo, con porcentajes superiores en los grupos de la zona H2 que en los de la zona H1 (H2>H1, H2S>H1S), a excepción de las fases líquidas (H1L>H2L).

**Tabla 27.** Porcentajes de aislados procedentes de la ría de Huelva resistentes a 2 µg/mL de ertapenem. (\*) Diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes sobre nutritivo y marino

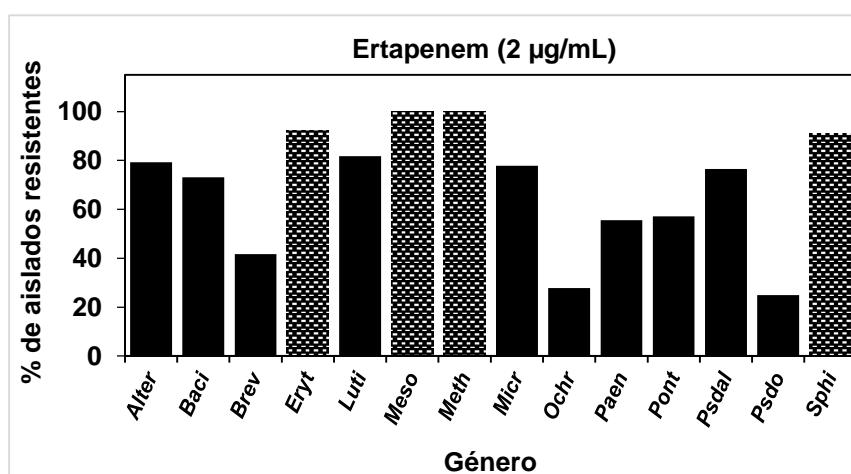
	% de ais. resistentes	Medio de cultivo		$\chi^2$ de Pearson	p
		Nutritivo (%)	Marino (%)		
HT	79,7	40,6	89,3	87,973	<0,001*
HM	82,7	-	82,7	-	-
HN	40,8	40,8	-	-	-
H1	59,0	29,2	89,7	69,84	<0,001*
H2	69,4	58,5	88,9	17,466	<0,001*
H1L	74,8	37,9	87,8	28,252	<0,001*
H2L	76,1	25	86,8	27,782	<0,001*
H1S	57,1	22	94,1	36,906	<0,001*
H2S	87,7	80	93,8	2,463	0,117

Como se puede observar (figura 21) tras representar el porcentaje de aislados resistentes por género (géneros con ocho o más aislados disponibles), más del 90% de los aislados de los géneros *Erythrobacter*, *Mesonina*, *Methylobacterium* y *Sphingopyxis* aparecen resistentes a este

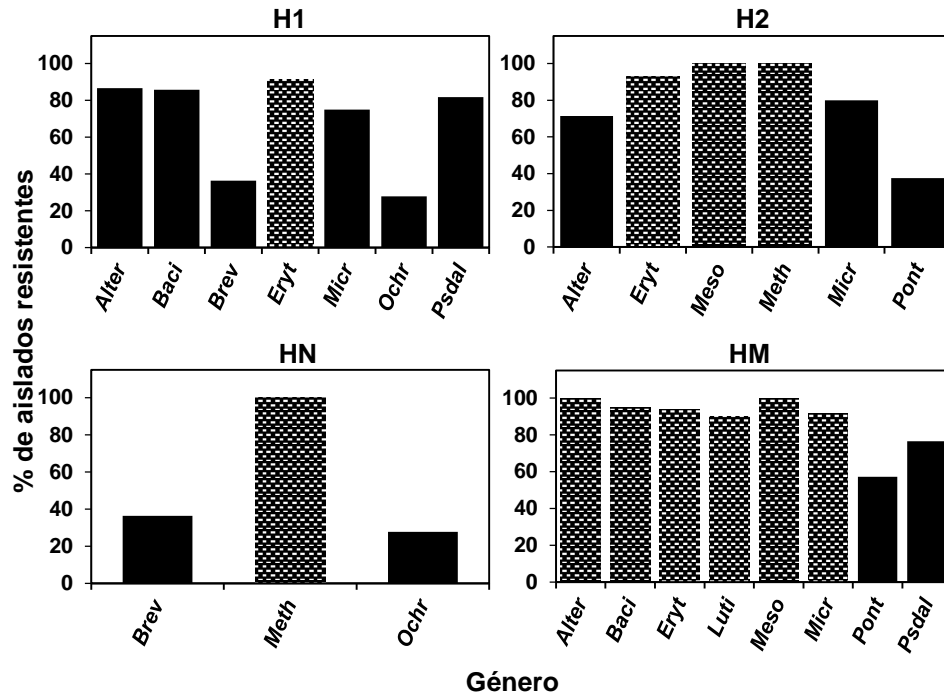


antibiótico. Siete géneros, excluyendo los considerados intrínsecamente resistentes, mostraron un nivel de resistentes >50% con un porcentaje medio de aislados resistentes de  $69,9 \pm 24,9\%$ . Por el contrario, los géneros con menor número de resistentes fueron *Pseudomonas* < *Ochrobactrum* < *Brevundimonas*.

Cuando se representaron los porcentajes de aislados resistentes de forma independiente según su muestra de origen o el medio de aislamiento, se observó (figura 22) que los mayores porcentajes de aislados resistentes observados en la figura 21 correspondían a aislados procedentes de medio marino, afectando considerablemente a los valores de porcentajes totales la alta proporción de los aislados en medio marino que se muestran resistentes al antibiótico.



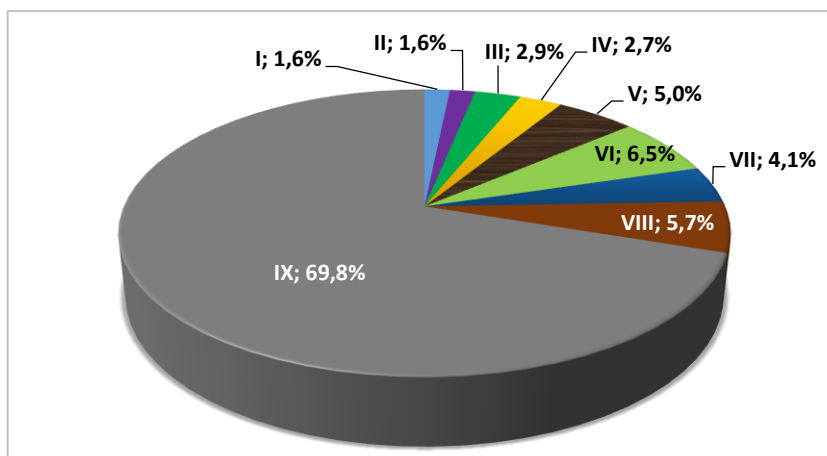
**Figura 21.** Porcentaje de aislados resistentes a ertapenem agrupados por géneros. Géneros: Alter.: Altererythrobacter, Baci.: Bacillus, Brev.: Brevundimonas, Eryt.: Erythrobacter, Luti.: Lutibacterium, Meso.: Mesonia, Meth.: Methylobacterium, Micr.: Microbacterium, Ochr.: Ochrobactrum, Paen.: Paenibacillus, Pont.: Ponticaulis, Psdal.: Pseudoalteromonas, Psdo.: Pseudomonas, Sphi.: Sphingopyxis. ▨— indica porcentajes  $\geq$  a 90,0%.



**Figura 22.** Porcentajes de los aislados identificados resistentes a ertapenem agrupados según las zonas de muestreo y los medios de cultivo. Géneros: *Alter.*: *Altererythrobacter*, *Baci.*: *Bacillus*, *Brev.*: *Brevundimonas*, *Eryt.*: *Erythrobacter*, *Luti.*: *Lutibacterium*, *Meso.*: *Mesononia*, *Meth.*: *Methylobacterium*, *Micr.*: *Microbacterium*, *Ochr.*: *Ochrobactrum*, *Pont.*: *Ponticaulis*, *Psdal.*: *Pseudoalteromonas*. ■-indica porcentajes  $\geq 90\%$ .

#### 4.3.1.3. CMI de ertapenem y su distribución según la procedencia, medio de aislamiento y género de los aislados

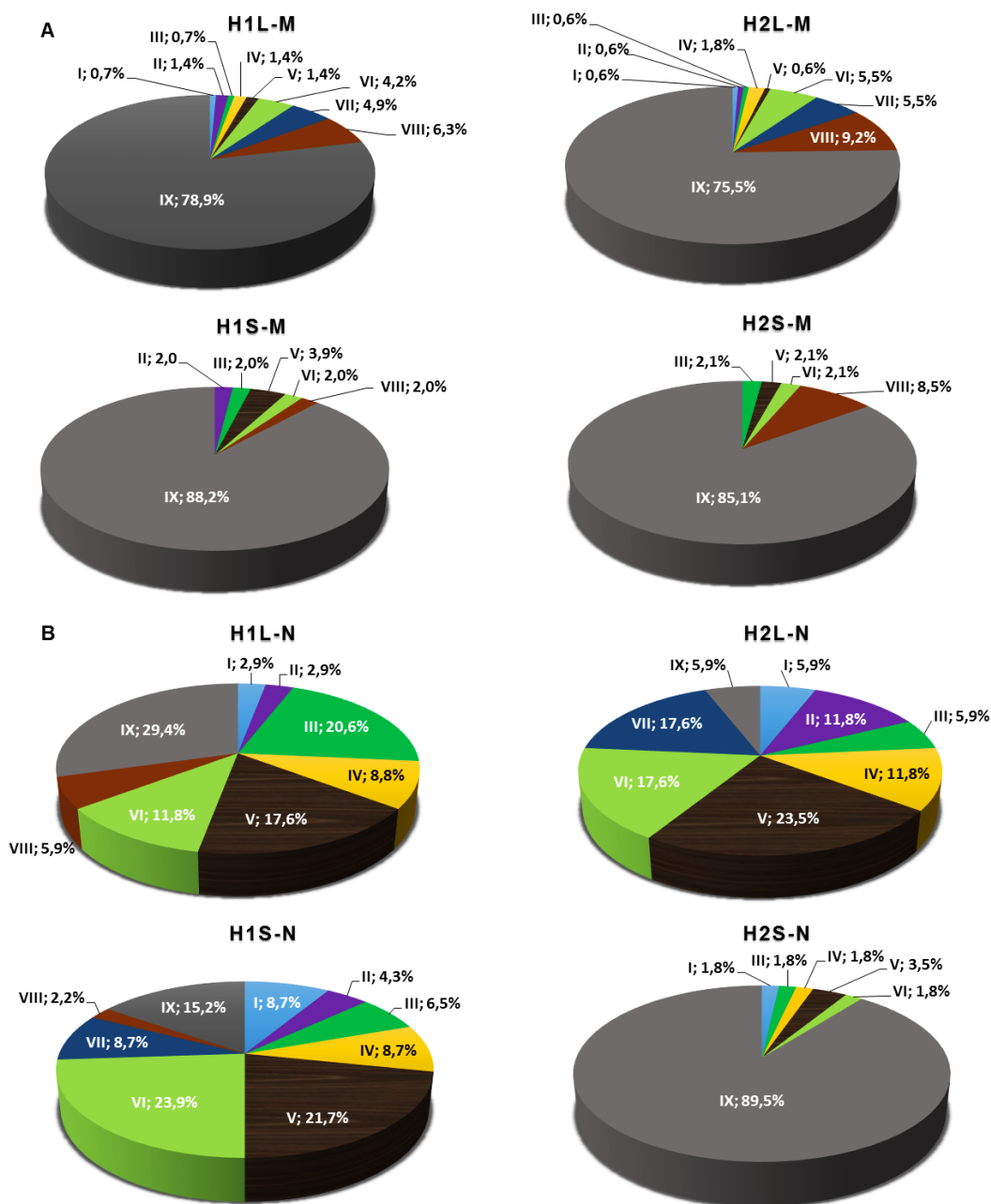
En base a los datos de crecimiento de los aislados en medios sólidos conteniendo distintas concentraciones del antibiótico se determinaron las CMI de *Ep* para cada aislado. Si representamos el porcentaje de aislados con los distintos valores de CMI (figura 23), se puede observar que se han encontrado aislados cuya CMI corresponde prácticamente a cada una de las concentraciones utilizadas, aunque para algunos aislados no se pudo determinar esta magnitud ya que o no crecieron ya a la mínima concentración utilizada (1,6%) o por el contrario fueron capaces de crecer a la máxima (69,8%).



**Figura 23.** Porcentajes de aislados según su CMI de ertapenem. Concentraciones de Ep: I:  $\leq 0,063$   $\mu\text{g/mL}$ , II:  $0,125$   $\mu\text{g/mL}$ , III:  $0,25$   $\mu\text{g/mL}$ , IV:  $0,5$   $\mu\text{g/mL}$ , V:  $1$   $\mu\text{g/mL}$ , VI:  $2$   $\mu\text{g/mL}$ , VII:  $4$   $\mu\text{g/mL}$ , VIII:  $8$   $\mu\text{g/mL}$ , IX:  $>8$   $\mu\text{g/mL}$ .

Si analizamos la distribución de los valores de CMIs de los aislados según la muestra de la que procedían y el medio sobre el que se aislaron (figura 24A y B) se observa que la mayoría de los aislados de medio marino (figura 24A), para cualquiera de las fases y muestras (H1L-M, H2L-M, H1S-M y H2S-M) poseen una CMI superior a la máxima concentración ensayada en este estudio. Entre el resto de los aislados de estos grupos, con la excepción del H1S-M, el valor de CMI más común fue  $8,0$   $\mu\text{g/mL}$ . Los valores de CMI correspondientes a los aislados obtenidos en medio nutritivo (figura 24B) estuvieron mejor distribuidos en la mayoría de los grupos considerados (H1L-N, H2L-N, y H1S-N), con la excepción de los del grupo de aislados H2S-N. El valor más común, sin tener en cuenta los que no pudieron ser determinados, fue  $1,0$   $\mu\text{g/mL}$  en los aislados de la zona H2 en ambas fases (H2L-N y H2S-N), y  $0,25$  y  $2,0$   $\mu\text{g/mL}$  para las fases líquida (H1L-N) y sedimento (H1S-N) de la zona H1, respectivamente. El porcentaje de aislados con una CMI  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$  fue superior para H1L-N que para H1S-N, pero fue mayor para H1S-M que para la correspondiente fase líquida. Para los aislados de la zona H2, los porcentajes de estos aislados del sedimento tanto en el medio marino como en el nutritivo (H2S-M y H2S-N) fue mayor que en las correspondientes fases líquidas (H2L-M y H2L-N), con una diferencia considerablemente más elevada entre una y otra fase en el caso de los aislados en el medio nutritivo (H2L-N y H2S-N).

## Resultados



**Figura 24.** Porcentajes de aislados según sus CMI y agrupados según sus zonas de procedencia y los medios de cultivo. **A:** aislados en M: medio marino, y **B:** aislados en N: medio nutritivo. CMI's a Ep: I:  $\leq 0,063 \mu\text{g/mL}$ , II:  $0,125 \mu\text{g/mL}$ , III:  $0,25 \mu\text{g/mL}$ , IV:  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , V:  $1 \mu\text{g/mL}$ , VI:  $2 \mu\text{g/mL}$ , VII:  $4 \mu\text{g/mL}$ , VIII:  $8 \mu\text{g/mL}$ , IX:  $>8 \mu\text{g/mL}$ .

También se analizó la distribución de los valores de CMI según los géneros considerando los de mayor número de aislados. Los resultados (tabla 28) indican que la mayoría de los miembros de aproximadamente la mitad de los géneros poseían una CMI  $>8,0 \mu\text{g/mL}$ , mostrando todos los aislados del género *Methylobacterium* este valor. Aparte de los aislados con una CMI  $>8,0 \mu\text{g/mL}$ , los CMI (en  $\mu\text{g/mL}$ ) más comunes entre los aislados

fueron según el género: *Altererythrobacter* 1,0 y 2,0, *Bacillus* 1,0, *Brevundimonas* 2,0, *Erythrobacter* 4,0, *Lutibacterium* 0,25, *Mesonía* 4,0 y 8,0, *Microbacterium* 2,0, *Ochrobactrum* 1,0, *Paenibacillus* 1,0, *Ponticaulis*  $\leq 0,063$  y 2,0, *Pseudoalteromonas* 8,0, *Pseudomonas*  $\leq 0,063$  y 0,25, *Sphingopyxis* 8,0 y  $>8,0$ .

**Tabla 28.** Abundancia relativa de los aislados dentro de cada género con los valores de CMI indicados..

	% de aislados con los CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) indicados								
	$\leq 0,063$	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	$>8,00$
<i>Altererythrobacter</i>	0,0	3,4	0,0	3,4	6,9	6,9	3,4	0,0	75,9
<i>Bacillus</i>	3,8	0,0	7,7	0,0	15,4	0,0	0,0	3,8	69,2
<i>Brevundimonas</i>	0,0	0,0	0,0	8,3	16,7	33,3	0,0	0,0	41,7
<i>Erythrobacter</i>	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	3,9	5,9	3,9	82,4
<i>Lutibacterium</i>	0,0	0,0	18,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	81,8
<i>Mesonía</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	10,0	80,0
<i>Methylobacterium</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>Microbacterium</i>	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	16,7	0,0	11,1	66,7
<i>Ochrobactrum</i>	0,0	0,0	11,1	16,7	33,3	11,1	22,2	0,0	22,2
<i>Paenibacillus</i>	0,0	11,1	11,1	0,0	22,2	0,0	0,0	11,1	44,4
<i>Ponticaulis</i>	14,3	0,0	0,0	7,1	7,1	14,3	7,1	7,1	42,9
<i>Pseudoalteromonas</i>	0,0	5,9	5,9	5,9	0,0	5,9	5,9	11,8	58,8
<i>Pseudomonas</i>	25,0	0,0	25,0	12,5	12,5	0,0	12,5	0,0	12,5
<i>Sphingopyxis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1	18,2	36,4	36,4

Considerando las CMIs de los géneros disponibles y con mayor número de aislados según las zonas de muestreo, se observó que la mayor parte de los aislados de 5 de los 7 géneros analizados de la zona H1 poseían una CMI superior a la máxima concentración utilizada: *Altererythrobacter* (85,7%), *Bacillus* (81,0%), *Erythrobacter* (78,3%), *Pseudoalteromonas* (63,6%) y *Microbacterium* (62,5%). Las CMIs más comunes entre los miembros de los otros 2 géneros fueron 1,0 y  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$  para los del género *Brevundimonas* y 1,0 y 2,0  $\mu\text{g/mL}$  para los del *Ochrobactrum*. La mayoría de los miembros de los géneros disponibles (5 de los 6 géneros analizados) procedentes de la zona H2 mostraron unos valores de CMI  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$ : *Methylobacterium* (100,0%), *Erythrobacter* (85,7%), *Mesonía* (75,0%), *Microbacterium* (70,0%) y *Altererythrobacter* (64,3%). Entre los aislados del género *Ponticaulis* las CMI más comunes fueron 2,0 y  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$ .

Al analizar las CMIs de los géneros agrupados según los medios de cultivo empleados, se observó que entre los aislados en medio nutritivo (3

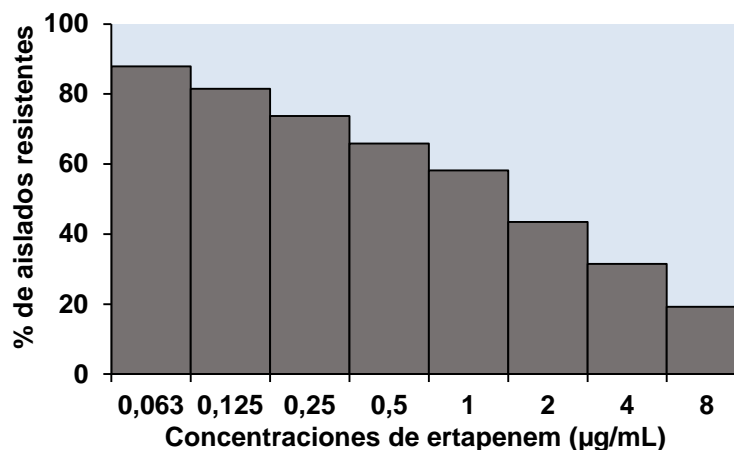
géneros analizados) todos los miembros del género *Methylobacterium* tenían CMI >8 µg/mL (100,0%), mientras que los valores más frecuentes de CMI en los géneros *Brevundimonas* y *Ochrobactrum* fueron 2,0 y >8,0 µg/mL y 1,0 µg/mL respectivamente. En cambio en los aislados del medio marino, se observó que la mayor parte de los miembros de los 7 géneros analizados poseían CMI superior a la máxima concentración utilizada: *Altererythrobacter* (95,7%), *Bacillus* y *Lutibacterium* (90,0%), *Erythrobacter* (83,7%), *Mesonina* (80,0%), *Microbacterium* (75,0%), *Pseudoalteromonas* (58,8%). Entre los aislados del género *Ponticaulis*, dejando a parte el 42,9% de aislados con CMI >8,0 µg/mL, los valores de CMI más frecuentes fueron 0,063 y 2 µg/mL. Por tanto, podemos afirmar que los aislados que crecieron sobre el medio marino mostraron CMI superior a los que crecieron sobre el medio nutritivo.

#### **4.3.2. Aislados procedentes de la Chorrera de Despeñalagua**

##### **4.3.2.1. Prevalencia de los aislados resistentes a distintas concentraciones del antibiótico**

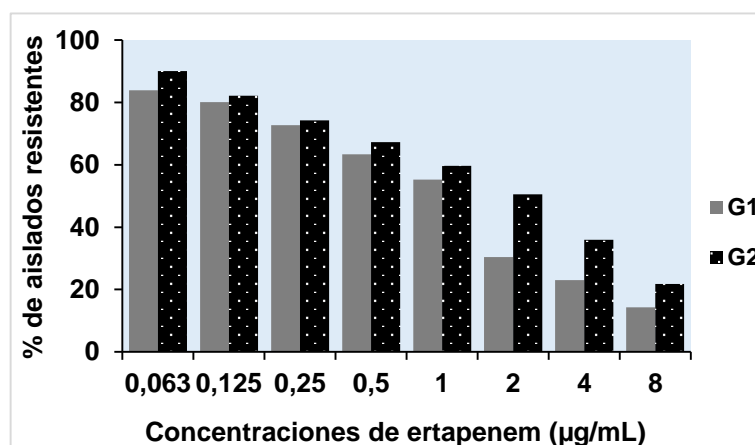
Se utilizaron las mismas concentraciones de antibiótico y método empleado para las muestras procedentes de la ría de Huelva para probar la resistencia a *Ep* de 464 aislados procedentes de las dos zonas de muestreo de la Chorrera de Despeñalagua. Algunos de los aislados originalmente obtenidos no pudieron recuperarse a partir de los glicerolados y por tanto no se pudieron analizar en este estudio.

Al igual que ocurría con los aislados de la ría de Huelva, se observa una disminución del número de aislados resistentes según se aumenta la concentración de antibiótico, si bien en este caso esta disminución es mucho más acusada (figura 25). El mayor porcentaje de resistentes se detectó a la concentración de 0,063 µg/mL (87,9%) mientras que a la concentración más alta probada (8,0 µg/mL) apenas un 19,2% fueron resistentes.



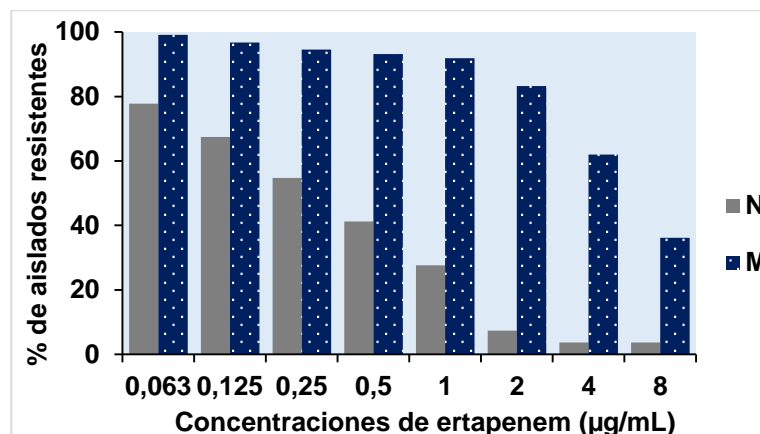
**Figura 25.** Porcentajes de aislados resistentes a distintas concentraciones de ertapenem.

El porcentaje de aislados resistentes entre los que procedían de la zona G2 fue superior al determinado para los procedentes de la zona G1, aunque solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambas muestras a concentraciones 0,063 µg/mL, 2,0 µg/mL y 4,0 µg/mL (figura 26).



**Figura 26.** Porcentajes de aislados resistentes a diferentes concentraciones de ertapenem según las muestras de procedencia.

Los porcentajes de aislados resistentes a distintas concentraciones del antibiótico según el medio de cultivo (figura 27) indican que están más representados entre los de medio marino que entre los de medio nutritivo a todas las concentraciones utilizadas, con diferencias que son estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).



**Figura 27.** Porcentajes de bacterias resistentes a diferentes concentraciones de ertapenem según el medio de cultivo. M: marino, N: nutritivo.

#### 4.3.2.2. Distribución de los aislados *Ep* según su procedencia, medios de aislamiento y géneros a los que pertenecen

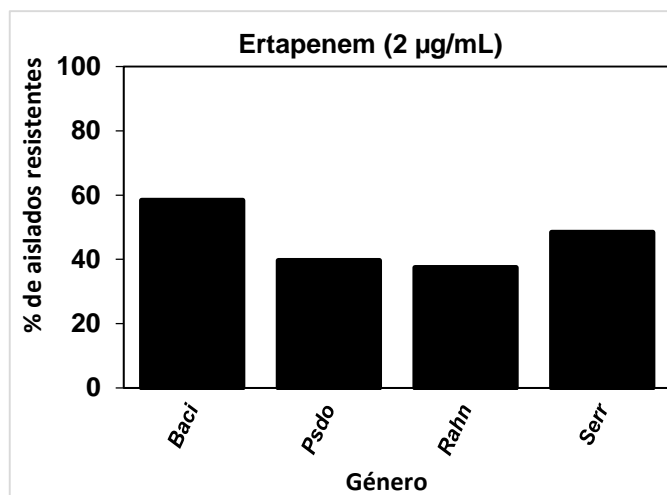
El análisis de la prevalencia de los aislados resistentes a *Ep* 2,0 µg/mL (tabla 29) mostró un alto porcentaje de resistentes entre el total de los aislados disponibles. Analizando la zona de muestreo, se observó un porcentaje superior ( $p < 0,001$ ) entre los aislados de la zona G2 que entre los de la zona G1. Considerando los grupos de aislados según el medio de aislamiento se observó una diferencia muy elevada entre los cultivados en medio marino y nutritivo a favor de los primeros ( $GM \gg GN$ ). Considerando cada zona de muestreo por separado, en ambas el porcentaje de aislados resistentes entre los correspondientes al medio marino fue mayor que entre los aislados sobre medio nutritivo ( $G1-M > G1-N$  Y  $G2-M > G2-N$ ) con mucha diferencia y significación estadística ( $p < 0,001$ ). Al comparar los aislados sobre el mismo medio procedentes de cada zona independiente se observa que las diferencias son pequeñas y estadísticamente no significativas ( $G1-M < G2-M$ ,  $p = 0,248$ , y  $G1-N > G2-N$ ,  $p = 0,210$ ).

**Tabla 29.** Porcentajes de aislados procedentes de la Chorrera de Despeñalagua resistentes a 2 µg/mL de ertapenem. Zonas de muestreo: G1 y G2, GT todos los aislados de la Chorrera de Despeñalagua. (\*) Diferencias significativas entre medios marino y nutritivo.

Muestra	% de ais. resistentes	Medio de cultivo		$\chi^2$ de Pearson	p
		Nutritivo (%)	Marino (%)		
GT	43,5	7,4	83,3	270,882	<0,001*
GM	89,1	-	89,1	-	-
GN	9,5	9,5	-	-	-
G1	33,3	9,6	80,9	79,689	<0,001*
G2	50,8	5,4	83,9	182,531	<0,001*

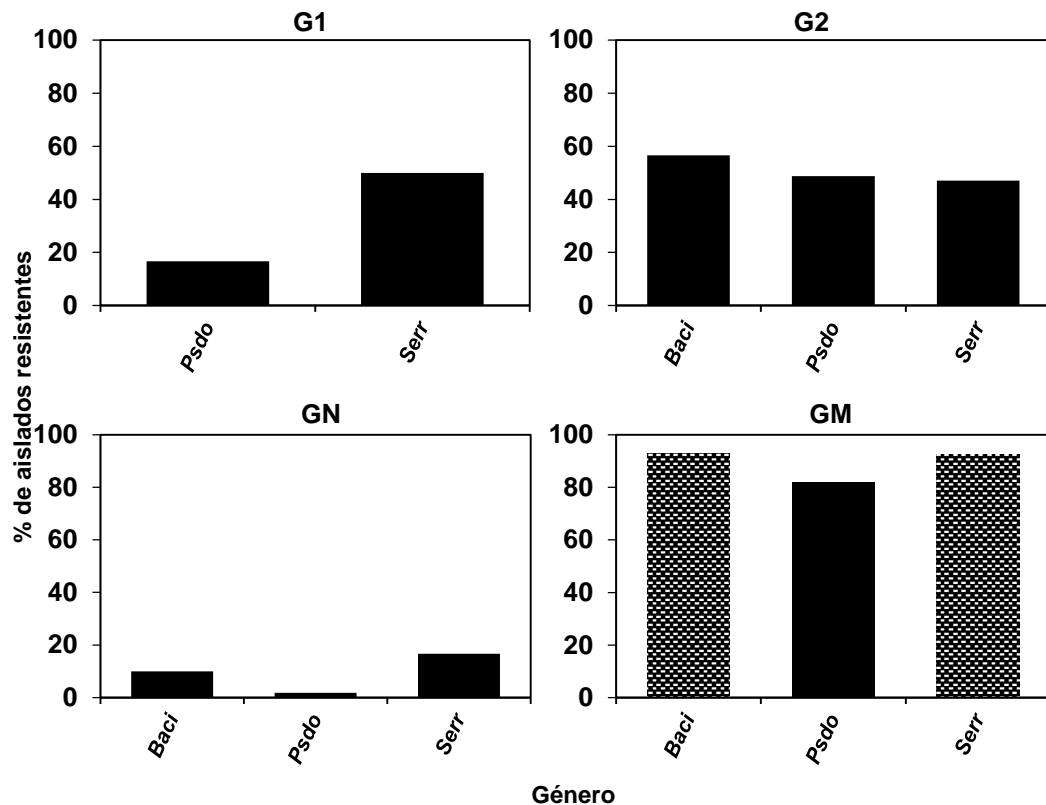


La distribución de los aislados resistentes por grupos filogenéticos (géneros) con 8 o más aislados (figura 28) muestra un porcentaje de aislados resistentes inferior al 90,0% en todos los géneros. Solo uno de los géneros, *Bacillus*, supera el 50,0% de resistentes. El valor medio de resistentes por género fue de 46,0%.



**Figura 28.** Abundancia relativa de aislados resistentes a ertapenem según el género al que pertenecen. Géneros: *Baci.*: *Bacillus*, *Psdo.*: *Pseudomonas*, *Rahn.*: *Rahnella*, *Serr.*: *Serratia*.

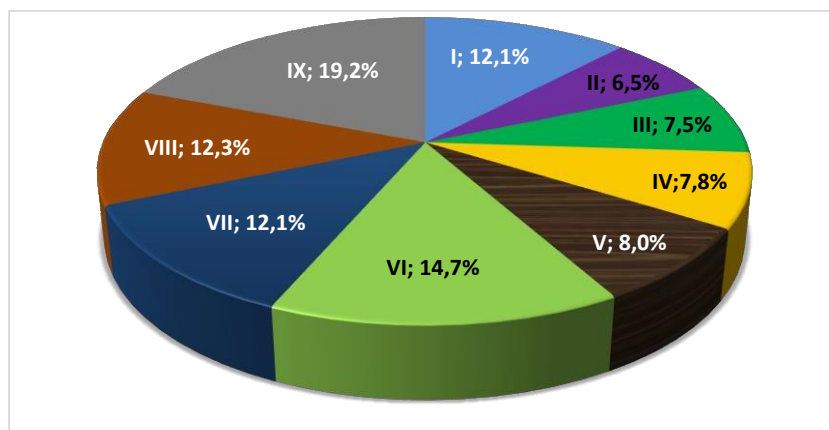
Si analizamos los porcentajes de aislados resistentes en cada género en relación a las zonas de procedencia y a los medios de aislamiento (figura 29) se observa que los porcentajes de aislados resistentes son mayores entre los géneros procedentes de la zona G2 que entre los procedentes de la zona G1. Considerando los aislados en medio marino de nuevo se observan porcentajes más elevados que en nutritivo, en particular en los casos de *Bacillus* y de *Serratia*.



**Figura 29.** Porcentajes de los aislados identificados resistentes a ertapenem agrupados según las zonas de muestreo y los medios de cultivo. Géneros: *Baci.*: *Bacillus*, *Psdo.*: *Pseudomonas*, *Serr.*: *Serratia*. M: medio marino, N: medio nutritivo.

#### 4.3.2.3. CMI de ertapenem y su distribución según la procedencia, medio de aislamiento y género de los aislados

Los valores de CMI encontrados, en las condiciones del análisis, abarcan todo el rango de concentraciones utilizado (figura 30). Algunos aislados se mostraron resistentes a la máxima concentración probada (19,2%), y por tanto sus CIMs son superiores a esa concentración, mientras que un 12,1% de muestras muestran una CMI  $\leq 0,063$   $\mu\text{g/mL}$ , al no mostrar crecimiento a esa concentración del antibiótico.



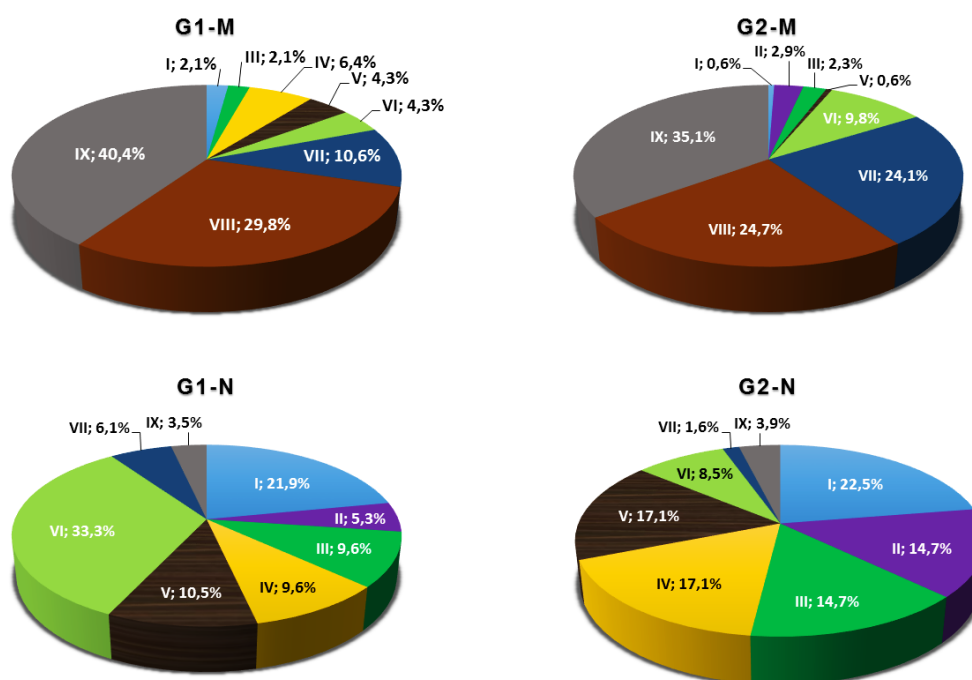
**Figura 30.** Porcentajes de aislados según su CMI de ertapenem. Concentraciones de Ep: I:  $\leq 0,063$   $\mu\text{g/mL}$ , II:  $0,125$   $\mu\text{g/mL}$ , III:  $0,25$   $\mu\text{g/mL}$ , IV:  $0,5$   $\mu\text{g/mL}$ , V:  $1$   $\mu\text{g/mL}$ , VI:  $2$   $\mu\text{g/mL}$ , VII:  $4$   $\mu\text{g/mL}$ , VIII:  $8$   $\mu\text{g/mL}$ , IX:  $>8$   $\mu\text{g/mL}$ .

La distribución de los valores de CMIs de los aislados según los medios de aislamiento y la zona de procedencia se resume en la figura 31. En ella se puede observar que un porcentaje elevado de los aislados en medio marino de ambas zonas de muestreo (G1-M y G2-M) poseen una CMI  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$ , aunque con porcentajes dentro de cada uno de estos grupos inferiores al 50%. Los porcentajes correspondientes de los aislados en medio nutritivo son bastante menores. El siguiente valor de CMI más frecuente entre los aislados en medio marino tanto de G1 como de G2 es  $8,0$   $\mu\text{g/mL}$ . Entre los aislados en medio nutritivo, y sin tener en cuenta los valores de CMI que no se han determinado (particularmente abundantes los valores  $\leq 0,063$   $\mu\text{g/mL}$ ), los valores más comunes fueron en G1  $2,0$   $\mu\text{g/mL}$  y en G2 distribuidos por igual entre  $0,5$  y  $1,0$   $\mu\text{g/mL}$ .

También se analizó la distribución de los valores de CMIs de los cuatro géneros con mayor números de aislados (tabla 30) observándose que el género con mayor porcentaje de aislados con una CMI superior a la máxima concentración de *Ep* utilizada fue *Bacillus*, seguido de los miembros del género *Serratia*. Porcentajes elevados de aislados con valores de CMI  $\leq 0,063$   $\mu\text{g/mL}$  se observaron en los géneros *Rahnella* y *Serratia*. Dejando aparte los aislados con una CMI indeterminada ( $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$  o  $\leq 0,063$   $\mu\text{g/mL}$ ), los valores se distribuyeron alrededor de  $0,5$  y  $4,0$   $\mu\text{g/mL}$  para los miembros del género *Bacillus*, alrededor de  $2,0$   $\mu\text{g/mL}$  para los de

## Resultados

*Pseudomonas*, y en torno a 8,0 µg/mL para *Serratia*. La distribución en los del género *Rahnella* es casi homogénea entre los valores de 0,5-8,0 µg/mL.



**Figura 31.** Porcentajes de aislados según su CMI y agrupados según sus zonas de procedencia y los medios de cultivo. **A:** en M: medio marino y **B:** en N: medio nutritivo, Concentraciones de Ep: I:  $\leq 0,063$  µg/mL, II: 0,125 µg/mL, III: 0,25 µg/mL, IV: 0,5 µg/mL, V: 1 µg/mL, VI: 2 µg/mL, VII: 4 µg/mL, VIII: 8 µg/mL, IX:  $>8$  µg/mL.

Analizando la distribución de las CMIs de los aislados de cada género según las muestras de procedencia, se observó que en la G1 un 53,3% de los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* poseían una CMI de 2,0 µg/mL mientras que entre los miembros del género *Serratia*, las CMIs más comunes fueron  $\leq 0,063$  y  $>8,0$  µg/mL con 28,6% y 35,7% respectivamente. Para la muestra G2, se observó que la mayoría de los aislados del género *Bacillus* mostraron valores de CMI  $>8,0$  µg/mL mientras que en una buena parte de los miembros de *Serratia* estos valores fueron  $\leq 0,063$  µg/mL y las más frecuentes entre los aislados de *Pseudomonas* fueron 4,0, 8,0 y  $>8,0$  µg/mL.

**Tabla 30.** Abundancia relativa de los aislados dentro de cada género con los valores de CMI indicados.

	% de aislados con los CMIs (µg/mL) indicados								
	≤0,063	0,125	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	8,00	>8,00
<b><i>Bacillus</i></b>	0,0	0,0	0,0	16,7	12,5	12,5	16,7	8,3	33,3
<b><i>Pseudomonas</i></b>	3,8	8,5	9,4	8,5	8,5	21,7	16	11,3	12,3
<b><i>Rahnella</i></b>	25,0	0,0	0,0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<b><i>Serratia</i></b>	35,5	3,2	3,2	3,2	0,0	6,5	6,5	19,4	22,6

Considerando los medios de cultivo, el 61,1% de los aislados en el medio nutritivo del género *Serratia* mostraron una CMI ≤0,063 µg/mL, mientras que para *Bacillus* los valores más comunes fueron 0,5 y 1,0 µg/mL y para *Pseudomonas* 0,125-2,0 µg/mL. En cambio, los valores de CMIs más frecuentes de los aislados en medio marino de los 3 géneros analizados fueron para *Bacillus* y *Pseudomonas* 4,0->8,0 µg/mL y para *Serratia* 8,0 y >8,0 µg/mL.

## **5. *DISCUSIÓN***



## 5. DISCUSIÓN

El trabajo que se ha realizado para esta tesis doctoral se enmarca en una línea de investigación encaminada al estudio de la diversidad de bacterias resistentes a antibióticos en el medio ambiente y de los elementos genéticos y genes responsables de las resistencias, con la intención de determinar su relación con lo conocido en ambientes clínicos y en base a la idea establecida, pero demostrada solo en unos pocos casos, de que el origen de las resistencias clínicas tuvo lugar en bacterias ambientales (Humeniuk *et al.* 2002, Aminov 2009, Zheng *et al.* 2011, Forsberg *et al.* 2012, Blair *et al.* 2015). En ese camino, el objetivo del trabajo realizado para esta tesis doctoral ha sido la determinación de la abundancia de bacterias resistentes a antibióticos así como la diversidad filogenética y los niveles de multirresistencia de las que se mostraron resistentes a ampicilina, un antibiótico perteneciente a una de las familias de antibióticos más comúnmente utilizadas en clínica, en dos sistemas acuáticos muy diferentes, un sistema salino y contaminado en distintas formas, metales pesados, residuos industriales y aguas residuales, como la ría de Huelva (Olías *et al.* 2006, Nieto *et al.* 2007, Sarmiento *et al.* 2009, Pérez-López *et al.* 2011), y otro de agua dulce y cuasi prístino, la Chorrera de Despeñalagua en la provincia de Guadalajara.

Al inicio del proyecto, y durante el desarrollo del mismo, se han tenido que tomar ciertas decisiones con el fin de hacer viable el estudio, obteniendo el mayor y más representativo número de datos, y enfocándolo en la posible importancia clínica de la resistencia a antibióticos. Puesto que la determinación de bacterias resistentes a antibióticos a partir de las muestras medioambientales, u otras, no es un proceso directo, el estudio solo se puede realizar sobre bacterias cultivables, de forma que se puedan seleccionar las resistentes en presencia de un antibiótico determinado, a una o unas concentraciones determinadas de éste, y en un medio y unas condiciones de cultivo concretas. Es obvio que todos estos factores tiene una influencia en el resultado final obtenido y por tanto en las conclusiones extraídas.

En cuanto a los antibióticos a emplear, se escogieron originalmente diez antibióticos de uso común y uno considerado de último recurso en ciertas

infecciones, la vancomicina, si bien, y debido al aumento de la prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos, el uso de éste está siendo ya común (Nesme *et al.* 2014). En general, los antibióticos elegidos tienen espectros de acción relativamente amplios y mecanismos de acción diversos. En algunos casos se han empleado varios antibióticos de la misma familia cuando existen un número considerable de ellos o poseen mecanismos de acción con ciertas diferencias específicas. En una etapa más tardía se incluyó otro antibiótico más, el ertapenem, un antibiótico betalactámico considerado de último recurso. Este antibiótico es de la familia de las carbapenemas y es utilizado solo en ciertas infecciones extrahospitalarias graves (Gobernado y Acuña 2007). Se estudió la prevalencia de la resistencia a este antibiótico y se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las bacterias resistentes a ampicilina previamente aisladas de los dos ecosistemas estudiados. Las concentraciones que se emplearon en los estudios realizados fueron elegidas a partir de datos existentes en la literatura y publicados por distintas instituciones como guías para el empleo de antibióticos en clínica, ya que no existen estudios específicos de los niveles de resistencia a antibióticos en bacterias medioambientales, para las que valores de concentraciones límite resistencia/susceptibilidad no han sido determinados. En algunos estudios, en los que se ha determinado la resistencia a antibióticos de bacterias de origen ambiental, se ha propuesto la utilización como concentración determinante de la resistencia un valor de 20 µg/mL para cualquier antibiótico (D'Costa *et al.* 2006, Walsh y Duffy 2013). Sin embargo, nosotros consideramos que este criterio no es correcto ya que distintos antibióticos presentan diferente potencia en su actividad inhibitoria y usando este valor único para cualquiera de ellos podríamos estar sobre o subestimando la resistencia. En este estudio utilizamos como concentraciones en las que el crecimiento de una bacteria se podría considerar como resistencia, unas algo superiores a las que por término medio se han considerado en el caso de bacterias clínicas diversas, valores estos últimos que por otra parte pueden ser diferentes según las distintas bacterias, los distintos estudios o agencias que los publican e incluso dependiendo del año de emisión de los informes (MENSURA 2000, EUCAST 2013, EUCAST 2014). Los antibióticos elegidos y las concentraciones



empleadas se han recogido en la sección de materiales y métodos, mientras que los rasgos principales de sus mecanismos de acción se han indicado en la introducción de esta memoria.

En principio, la selección de las bacterias resistentes a los antibióticos se podría realizar en cultivos en medio líquido o sólido, sin embargo el uso de los primeros podría llevar a fenómenos de interferencia en el crecimiento de unas bacterias por otras, dificultándolo (competencia) o facilitándolo (interacciones simbióticas o comensales), así como a fenómenos de transferencia horizontal de genes o incluso de aparición de resistencias previamente no existentes debido a la presencia del antibiótico en el medio (p.ej. antibióticos promotores de mutaciones, o inductores de expresión de genes de resistencia (Hastings *et al.* 2004, Da Re y Ploy 2012). Aunque este último efecto no podría ser evitado, la utilización de medios sólidos permite en mayor medida un crecimiento independiente de las distintas bacterias, sin posibilidad de transferencia sobrevenida de genes de resistencia, permitiendo también una enumeración de la abundancia de bacterias resistentes y una observación la diversidad morfológica de sus colonias. Se eligieron dos medios de cultivo en función de las muestras a analizar y los objetivos buscados. Puesto que no se pretendía una descripción de todas las bacterias resistentes a los antibióticos que se pudieran cultivar, sino de aquellas que pudieran tener un contacto con bacterias capaces de infectar al hombre o los animales a las que pudieran transferirles genes de resistencia, o bien que de por sí fueran capaces de infectarlos, se eligieron dos medios que consideramos podrían ser representativos de los medios acuáticos donde estas bacterias pudieran desarrollarse y tener contacto con patógenos, un medio nutritivo clásico y un medio marino. Como se ha sugerido (Mary *et al.* 2000), aquellas bacterias que crecen en medios con muy bajos nutrientes y a unas bajas temperaturas no son probablemente agentes importantes en la salud pública.

Las condiciones para el cultivo de las bacterias que se eligieron fueron, por un lado la temperatura que se consideró como la más apropiada al fin perseguido, 30°C, una temperatura entre la óptima para posibles bacterias capaces de crecer sobre el hombre y las temperaturas medias más

comúnmente utilizadas para cultivo de bacterias ambientales, y por otro un tiempo de incubación de los cultivos de 5 días, con el fin de detectar bacterias con distintas velocidades de crecimiento.

A continuación se discuten distintos aspectos de los resultados obtenidos que nos han permitido extraer las conclusiones que se indican en la sección correspondiente de esta memoria.

## **5.1. Características y parámetros fisicoquímicos de las zonas de estudio y de las muestras analizadas**

### **5.1.1. Ría de Huelva**

Las características fisicoquímicas de las muestras fueron analizadas, no observando grandes diferencias entre ambas en cuanto a pH y solo una ligera diferencia en la salinidad. La composición elemental de las aguas (tabla 7), con un nivel algo menor de los metales más abundantes en la zona H1 podría estar relacionada con una mayor lejanía del mar de ésta y se reflejaría en las pequeñas variaciones de salinidad y conductividad observadas. Los metales pesados, sin embargo estarían en mayor concentración en la muestra H1, posiblemente por tener una mayor proporción de agua procedente del río Tinto.

En la composición elemental de los sedimentos de las zonas de muestreo (tabla 8), se pudo apreciar una concentración mayor de Cu y Fe, en la zona H1 que puede deberse a que esta zona se encuentra en las marismas del río Tinto, que es el que aporta estos elementos a la ría de Huelva en mayor proporción (Olías *et al.* 2006) y de las cuales el Fe podría precipitar, por ejemplo en forma de fosfatos, al encontrarse con los residuos de éstos que pudieran llegar a esa zona con las mareas altas desde las balsas de fosfoyesos de la empresa Fertiberia S.A. La menor proporción de Fe en la zona H2 podría deberse a una mayor dilución del fosfato en esa zona y un movimiento mayor de los sedimentos durante los cambios de bajamar a pleamar y viceversa. Por otro lado, la mayor concentración de As en la zona H2 podría tener su origen en la planta metalúrgica situada en el polo químico muy próximo a ella y a la que se atribuye la aportación principal de este elemento en esa zona (Pérez-López *et al.* 2011).

A la vista de estos datos podemos decir que hay algunas diferencias entre la composición de las aguas y de los sedimentos de las dos zonas de muestro y en algunas propiedades fisicoquímicas, desconociéndose el efecto que estas diferencias podrían tener en la microbiota de ambas zonas, sobre todo teniendo en cuenta que las mareas podrían estar actuando en la homogeneización de dichas características y quizás de la diversidad de bacterias que puedan existir entre ellas.

### **5.1.2. Chorrera de Despeñalagua**

Parámetros fisicoquímicos como la temperatura, pH y salinidad muestran muy pocas diferencias entre los dos puntos de muestreo en esta zona. Ambas puntos están conectados en una dirección única de forma que las aguas de la zona G1 cuando llegan al suelo, transcurren por un lecho de piedra llegando en parte hasta la zona G2. Mientras que la muestra denominada G1 fue agua corriente recogida directamente del salto de agua de la chorrera, la muestra de G2 es un agua remansada en una zona pequeña y plana de roca, unos metros más abajo de la caída de agua. La cantidad de agua que llega desde la cascada a esta zona es mínima y sale de la pequeña charca lentamente, lo que permite que el agua se caliente algo por la irradiación solar, teniendo una temperatura algo más alta que las aguas que caen desde la cascada. El acceso de visitantes a la zona alta de la cascada es poco frecuente, mientras que la zona de muestreo G2 es más accesible, por lo que podría tener una mayor influencia antropogénica. A pesar del pequeño tamaño de la charca, ésta no se seca durante el verano. En ninguna de las dos muestras se obtuvo sedimento, aunque en la zona G2 el agua tiene algunos restos de vegetales, que no se separaron en el estudio realizado.

El análisis semicuantitativo de la composición elemental de las aguas de estas dos zonas (tabla 17), muestra que no existen grandes variaciones entre ellas. Las diferencias en las concentraciones de elementos como Ba, Ca, Fe, K, Mg y Na, podrían deberse a que como hemos mencionado arriba, los dos puntos de muestreo tienen características diferentes tales como un mayor recorrido del agua y un mayor tiempo de residencia en la zona de muestreo G2, lo cual permitiría la disolución de más elementos en el agua.

Además, ambas zonas pueden verse afectadas por distintos factores bióticos y abióticos. En principio, los factores fisicoquímicos similares, excepto la temperatura y una ligera mayor abundancia de algunos metales en G2, no parece que pudieran explicar las diferencias de biodiversidad encontradas. Quizás estas diferencias pudieran ser debidas a una mayor influencia antropogénica o de otros componentes biológicos sobre la zona G2 que sobre la G1.

## **5.2. Abundancia de bacterias totales, cultivables y resistentes a antibióticos**

### **5.2.1. Ría de Huelva**

En las muestras ambientales, se encuentran bacterias viables no cultivables (BVNC) que crecen en condiciones naturales latentes pero que no han podido ser cultivadas en el laboratorio (Roszak *et al.* 1987), por lo que el recuento directo con microscopía de epifluorescencia, sería la mejor opción para su cuantificación (Lunau *et al.* 2005). Los valores de la densidad microbiana encontrados fue del orden de  $10^7$  cél/mL, aunque ligeramente superior en la muestra H1L que en la H2L.

Según varios estudios, se estima que apenas entre el 0,001 y el 3% de los microorganismos en los ambientes naturales pueden ser cultivados en el laboratorio (Amann *et al.* 1995, Torsvik *et al.* 2003). Para determinar la abundancia de bacterias cultivables se realizaron recuentos mediante cultivo en medios sólidos sin antibióticos. Se observaron por lo general bajos porcentajes de bacterias cultivables sobre medio marino, 3% y 0,23% para H1L y H2L, respectivamente. Valores similares al determinado para H1L fueron encontrados por Button y cols. (1993) en muestras de aguas de la costa holandesa, con solo un 2%. En otro estudio con muestras del mar Mediterráneo, se observó un 3% (Bernard *et al.* 2000). La razón de la baja abundancia de bacterias cultivables en medio marino en las aguas de la muestra H2L, podría deberse a la presencia de contaminantes tóxicos como el As y el Al detectados en esta zona, o incluso por los vertidos de la EDAR que pudieran aportar antibióticos, al no ser completamente eliminados en el proceso de depuración (Zhou *et al.* 2013). La influencia antropogénica que ocasiona la presencia de estos tóxicos, así como los movimientos y mezclas

de aguas de los ríos y marinas podrían haber generado que se seleccionaran tipos de bacterias adaptadas a esas particulares condiciones, modificando así la composición de la microbiota de esta zona de la ría con respecto a otros ambientes marinos más naturales, o contaminados con otros tipos de contaminantes o con menores movimientos de las aguas, como podría ser la zona H1. Las abundancias de bacterias cultivables en medio nutritivo fueron menores que en medio marino en ambas zonas y en ambas fases, aunque las diferencias entre las de un medio u otro fue mayor en los sedimentos posiblemente indicando una menor homogeneización entre estos que entre las fases líquidas.

Las bacterias resistentes a los antibióticos se contaron sobre medios sólidos con cada antibiótico por separado a las concentraciones requeridas (tabla 4). En general, se observaron porcentajes intermedios o bajos de resistentes en ambas zonas, fases y medios (figura 9). Los porcentajes de resistentes a *Tc* en medio marino fueron elevados, al igual que los de resistentes a *Tm* sobre ambos medios. Considerando las dos muestras y sus dos fases, los porcentajes de bacterias resistentes fueron en general mayores entre las cultivadas en medio marino. Estos porcentajes mayores podrían estar relacionados con el crecimiento más activo de estas bacterias en las condiciones salinas de la ría, lo que permitiría unas mayores posibilidades de intercambio genético o una mayor competencia entre las bacterias con selección de las más resistentes. Por el contrario el crecimiento posiblemente menos activo de las bacterias detectadas sobre medio nutritivo, en un ambiente salino, produciría un efecto contrario sobre la prevalencia de bacterias resistentes entre las cultivadas en ese medio. Por otro lado, la elevada proporción de bacterias resistentes a *Tc* entre las cultivables en medio marino podría ser la consecuencia de una interferencia negativa de los componentes del mismo en la actividad del antibiótico que, por interacción con éste, afectase a la concentración efectiva del mismo, o a su entrada en las células al modificar sus propiedades. La interacción de los componentes del medio con las bacterias de forma directa, o la osmolaridad del mismo, podría afectar su capacidad de captar el antibiótico o incluso podríamos considerar un efecto sobre la afinidad de la diana del antibiótico. Otra

posibilidad sería que las bacterias cultivables en medio marino hubiesen desarrollado y/o intercambiado con facilidad entre ellas sistemas de expulsión del antibiótico, tales como los basados en bombas de eflujo, que podrían ser utilizadas para la adaptación de la bacteria al medio salino o a la presencia de metales pesados. Igualmente otros sistemas de resistencia más específicos podrían ser más predominantes en las bacterias cultivables en medio marino por haber sido transferidos en elementos móviles entre esa población de bacterias.

Se conoce que la entrada de *Tc* en las células puede verse afectada positiva o negativamente por la presencia de materia orgánica en el medio (Chen *et al.* 2015a) y se ha estudiado el efecto de distintas sales sobre la actividad de varios antibióticos, obteniéndose resultados que dependen de la forma de aplicar el estrés salino, del antibiótico y de la bacteria estudiada (Navavaty *et al.* 1998, McMahon *et al.* 2007, Crompton *et al.* 2014, Al-Nabulsi *et al.* 2015). En el estudio de Navavaty y cols. (1998), las concentraciones utilizadas de NaCl fueron como máximo del 0,9%, inferior a la del medio marino (1,9%), no observándose ningún efecto sobre la susceptibilidad a los antibióticos utilizados. En otros estudios se llegaron a utilizar concentraciones salinas más elevadas como 5% (Crompton *et al.* 2014) o incluso hasta 12% (McMahon *et al.* 2007, Al-Nabulsi *et al.* 2015), observándose, en estos casos, un efecto de adaptación de las bacterias tratadas, que en algunos casos fue permanente, originando una disminución de la susceptibilidad a los antibióticos empleados. En el estudio de Al-Nabulsi y cols. se probó el efecto de la incubación durante 24h con concentraciones de NaCl entre 2% y 12% sobre la susceptibilidad de *Listeria monocytogenes*, observando un incremento de las CMI al incrementarse el estrés salino aplicado. El efecto fue dependiente del antibiótico y muy especialmente de la cepa utilizada. En este estudio se emplearon algunos de los antibióticos que nosotros hemos usado, *Ap*, *Sm*, *Tc* y *Vm*, observándose que, a la concentración de NaCl más próxima a la del medio marino,  $\approx 2\%$ , la CMI de *Ap* aumentó de 0,5 a 2 veces para las tres cepas utilizadas, lo que supondría una CMI  $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$  en esas condiciones. Para *Sm* la CMI aumentó entre 0 y 4 (CMI  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ ) y para *Tc* el aumento fue de 0,5 a  $>4$  veces (CMI  $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ ), dependiendo de la cepa

en ambos casos. Finalmente para *Vm* el aumento fue entre 2,1 y >4 veces (CMI  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ ). En el estudio de McMahon *et al.* (2007), utilizaron *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella entérica* serovar Typhimurium y entre los antibióticos utilizados incluyeron *Em* para *S. aureus*, *Nx* para *E. coli*, y *Tm* para *S. entérica*. Midieron aumentos de CMI, a concentraciones de NaCl >4,5%, de 0,5 a 4 veces para *Nx*, (CMI  $\leq 20$   $\mu\text{g/mL}$ ), para *Tm* observaron desde una disminución hasta 4 veces hasta un aumento de 4 veces en los valores de la CMI, (CMI  $\leq 12$   $\mu\text{g/mL}$ ) y aumentos desde 0,5 a > 4 veces en las CMI de *Em* (CMI  $\leq 12$   $\mu\text{g/mL}$ ). Todos estos estudios, utilizando distintas bacterias, varias cepas de las mismas y distintas concentraciones de sal, mostraron en general un efecto de aumento de la CMI a concentraciones de NaCl iguales o superiores a las del medio marino. Esto se interpreta como un efecto de la osmolaridad del medio sobre la expresión de determinantes de resistencia que afectan en menor o mayor medida a diferentes antibióticos. Teniendo en cuenta las concentraciones de antibióticos utilizadas en nuestro estudio para determinar la resistencia (tabla 4), todos los valores de CMI observados en los estudios descritos fueron inferiores a esas concentraciones y por tanto estas bacterias adaptadas a elevadas concentraciones de NaCl no hubieran crecido en las condiciones de nuestro estudio. Comparando con las bacterias utilizadas en estos estudios, deberíamos considerar a las bacterias resistentes detectadas por nosotros como altamente resistentes a los antibióticos. En el estudio de Navavaty y cols. (1998) también se determinó, para distintas cepas de *E. coli*, que iones divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  pueden afectar a la CMI de antibióticos como *Km* o *Tc*, pero no de *Cc*. El incremento fue dependiente de la concentración de los iones, determinándose que para *Tc* se producía un incremento de 2,8 veces de la CMI a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 20 mM (CMI  $\leq 2,8$   $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que el efecto se estabilizaba a concentraciones entre 30 y 50 mM, con incrementos de la CMI de alrededor de 4 veces. La concentración de este ión en el medio marino, según la composición publicada por el fabricante, es de 16,2 mM. El efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  fue estudiado a concentraciones máximas de 50 mM, inferiores a aquellas en las que se encuentra en el medio marino (92,4 mM), midiendo, a la máxima concentración utilizada, un incremento de 6,5 veces en la CMI (CMI  $\leq 6,5$   $\mu\text{g/mL}$ ). El efecto parecía estabilizarse entre

40 y 50 mM de  $Mg^{2+}$ . Estos resultados supondrían que el efecto de estos iones presentes en el medio marino no afectarían al crecimiento de estas cepas en nuestras placas de medio marino, a la concentración de *Tc* empleada (tabla 4). El mecanismo por el que se dan estos fenómenos se desconoce, aunque podría estar relacionado con la capacidad de la tetraciclina de formar complejos con iones divalentes (Novák-Pékli *et al.* 1996) o podría producirse, como se ha considerado para otros antibióticos, por interacción de los iones con la bacteria más que con el antibiótico (Medeiros *et al.* 1971, Navavaty *et al.* 1998). Se ha descrito que sales como NaCl o  $(NH_4)_2SO_4$  no afectan a la interacción del antibiótico con el ribosoma en sistemas de síntesis de proteínas *in vitro* (Sanz *et al.* 1993, Marín *et al.* 1995) y un estudio reciente del efecto de la adaptación de dos especies de *Salmonella* a concentraciones crecientes de NaCl ha mostrado que el tratamiento afecta a la susceptibilidad de estas bacterias (Yoon *et al.* 2013), en *S. typhimurium* disminuyéndola y en *S. enteritidis* aumentándola, entre otros antibióticos a la oxitetraciclina, un antibiótico de la familia de las tetraciclinas. En este estudio no se determinó la resistencia directa al antibiótico sobre un medio con la sal, sino que las bacterias fueron adaptadas al crecimiento con hasta 4% de NaCl, por lo que los efectos observados dependerían de la propia bacteria y de los cambios producidos en ella durante la adaptación. El cultivo de las bacterias directamente en medio con 4% de NaCl, sin previa adaptación, no tuvo efecto sobre la resistencia a los antibióticos. Un estudio similar llevado a cabo con dos cepas de *L. monocytogenes* (Lee *et al.* 2012), en el que se llegó a usar hasta un 6% de sal, dio resultados similares aunque el efecto observado en ambas cepas fue muy pequeño para la oxitetraciclina. Aunque de forma indirecta estos estudios sugerirían que los antibióticos de la familia de las tetraciclinas, al menos los estudiados, pueden ver afectada su actividad por el efecto de la adaptación a medios salinos de algunas bacterias de una forma que depende más de la adaptación de los microorganismos a la sal que por un efecto sobre la actividad del antibiótico. Buena parte de los sistemas de resistencia a tetraciclina conocidos se basan en bombas de membrana que expulsan el antibiótico de la célula de forma inespecífica o incluso específica, estando estos últimos codificados en elementos genéticos móviles (Nelson y Levy



2011, Fernández y Hancock 2012) y que quizás podrían ver modificada su expresión en algunas bacterias en presencia de ciertas condiciones salinas. En un reciente estudio realizado sobre muestras de suelos se encontró que el 83 % de las bacterias multirresistentes detectadas lo eran por mecanismos basados en bombas de eflujo, y el 80% entre las resistentes a *Tc* (Walsh y Duffy, 2013). Que el efecto observado en nuestro estudio se deba a una u otra causa está por determinar y se abordará en futuros estudios.

Los altos porcentajes observados de resistentes a *Tm*, fueron independientes del medio de cultivo empleado. En el estudio de Walsh y Duffy (2013) también detectaron porcentajes altos de bacterias resistentes a este antibiótico (>90%). Los mecanismos de resistencia a este antibiótico son en su mayoría conocidos desde hace tiempo (Huovinen 1987), sin embargo, en el estudio indicado se pudo identificar un nuevo mecanismo de resistencia a *Tm* que no había sido encontrado previamente, ni siquiera en medios clínicos, lo que pone de manifiesto la utilidad de este tipo de estudios.

### 5.2.2. Chorrera de Despeñalagua

Aunque la densidad microbiana de la muestra de la zona G2 es algo superior a la de la G1, ambas son del mismo orden ( $10^6$  cél/mL) y por lo tanto, no existen diferencias notables. Esto podría ser debido a la similitud, tanto de los parámetros fisicoquímicos como de la composición elemental, de ambas zonas. Esta abundancia es menor a la de la ría de Huelva, posiblemente por las condiciones del ecosistema en cuanto a los nutrientes disponibles y restricciones en el crecimiento por las bajas concentraciones salinas y las temperaturas más bajas registradas en la Chorrera de Despeñalagua.

La abundancia de bacterias cultivables es también muy baja debido posiblemente a los medios de cultivo empleados, con concentraciones de nutrientes demasiado elevadas bacterias oligotróficas. El empleo de estos medios en vez de otros oligotróficos, y de temperaturas más elevadas que las de las zonas de muestreo, son requerimientos del enfoque que se le dio a este estudio de detectar bacterias de posible influencia en medios clínicos, en los cuales bacterias oligotróficas, o psicrófilas, podrían ser poco relevantes (Mary *et al.* 2000). La proporción de bacterias cultivables, como cabría esperar por las propiedades fisicoquímicas de las aguas, fue mayor sobre

medio nutritivo que sobre marino. La mayor abundancia de cultivables en la muestra G2 que en la G1 podría reflejar una cierta mayor población de bacterias totales en G2 y otras características de esta zona como la temperatura de la zona, que fue algo mayor.

La abundancia de bacterias resistentes fueron en general mayores entre las cultivadas en medio nutritivo con algunas excepciones como las resistentes a *Ap*, *Nx* y *Tm*, principalmente para la muestra G2 y a *Tc*, en ambas muestras, que fueron más abundantes entre las de medio marino. La abundancia de resistentes a *Vm* fue notable en ambos medios y las dos muestras, principalmente en la G2. Esto podría indicar una resistencia intrínseca a *Vm* en la población de bacterias cultivables de la zona G2. Las bacterias resistentes a *Vm* en la muestra G1 son también las más abundantes sobre medio nutritivo y las segundas entre las de marino. El estudio de Walsh y Duffy (2013), mostró una prevalencia de > 90% de bacterias resistentes a *Vm* entre los aislados de suelos obtenidos por estos autores, con poca presencia de bombas de eflujo como responsables de la resistencia entre estos aislados, por lo que fueron considerados como intrínsecamente resistentes. En principio podríamos considerar que pudiera haber elementos genéticos promiscuos entre las especies bacterianas de la Chorrera que hayan podido homogeneizar la población de bacterias resistentes a este antibiótico, sin embargo se ha visto que los genes de resistencia a *Vm* portados por plásmidos no son aparentemente transferibles entre distintos géneros según algunos estudios (García-Migura *et al.* 2007, Werner *et al.* 2011), pero sí según otros en los que se ha encontrado, que pueden transferirse entre cepas de *Enterococcus faecalis* y *S. aureus*, (Zhu *et al.* 2013, Rossi *et al.* 2014). Un estudio metagenómico de genes de resistencia a antibióticos realizado con numerosas muestras ambientales y relacionadas con el hombre, detectaron una gran abundancia de genes de resistencia a *Vm*, tanto en suelos como en aguas marinas y en heces humanas (Nesme *et al.* 2014), aunque desgraciadamente no se ha descrito la diversidad bacteriana implicada.

Posiblemente la diferencia más notable entre las muestras y según los medios utilizados es la resistencia a *Ap* que, siendo abundante en ambas

muestras entre las bacterias que crecen sobre medio nutritivo, es sin embargo minoritaria en la muestra G1 y muy importante en la G2, cuando consideramos las cultivadas sobre medio marino. Esta notable diferencia podría reflejar la existencia en la población de grupos de bacterias específicos de esta muestra y que podrían proceder del entorno de esta zona de muestreo o de una aportación externa por la mayor influencia antropogénica que esta zona puede tener.

### **5.3. Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a ampicilina**

#### **5.3.1. Ría de Huelva**

Para la caracterización de las bacterias en cuanto a su posible resistencia múltiple a distintos antibióticos y su diversidad filogenética, se decidió el aislamiento de las resistentes a *Ap*, escogiendo las de diferentes fenotipos de colonia.

Se obtuvo un mayor número de aislados sobre medio marino (72,4%) que sobre medio nutritivo, lo que está de acuerdo con el tipo de muestras analizadas y refleja una mayor diversidad de fenotipos de las colonias en el medio marino. Los aislados en medio nutritivo proceden mayoritariamente de muestras de sedimentos (67,5%).

De los aislados obtenidos se determinó la resistencia adicional a los otros diez antibióticos usados originalmente, utilizando siempre un control de crecimiento de cada bacteria en su correspondiente medio con *Ap*. Se observaron 143 perfiles de resistencia (tabla 10) (anexo 1), lo que indica una amplia diversidad en la multirresistencia a los antibióticos entre los aislados obtenidos de la ría. La disponibilidad de estos aislados podría ser de utilidad en el futuro para determinar las posibilidades de transferibilidad de las resistencias observadas y los elementos genéticos implicados.

Se calcularon los valores del índice MAR como un indicador del nivel de multirresistencia de los aislados, observándose diferencias significativas entre los niveles de multirresistencia según el origen de los aislados, cuando se emplearon los parámetros estadísticos moda, mediana y media para su comparación (tabla 9). Utilizando la mediana como un valor más

representativo que la media del nivel medio de multirresistencia, se concluyó que considerando conjuntamente todos los aislados, estos serían resistentes a siete de los once antibióticos empleados, indicando un nivel alto de multirresistencia. El valor del índice MAR más frecuente entre todos los aislados de la ría, fue 0,73, indicando que es frecuente encontrar aislados de la ría con niveles elevados de multirresistencia (resistentes a ocho antibióticos de los once utilizados). En definitiva podemos ver que los aislados de la ría en su conjunto tienen elevados valores de multirresistencia si bien los de la zona H2 presentan un cierto mayor nivel de multirresistencia que los de la zona H1. Aunque la diferencia entre estas zonas no es muy elevada, quizás la menor diversidad de bacterias observada en la zona H2 (tabla 15) podría facilitar intercambios genéticos efectivos entre bacterias filogenéticamente más próximas que pudieran disminuir los cuellos de botella que tales transferencias pudieran tener (Thomas y Nielsen 2005, Martínez 2012, Martínez y Baquero 2014), aumentando la multirresistencia de las bacterias de esta zona, o la presencia de contaminantes o aportes de tóxicos procedentes de las industrias o de la EDAR de Huelva en la zona H2 pudiera hacer aumentar la selección de resistentes o multirresistentes en esta zona (Ma *et al.* 2006). Los datos indicarían unos mayores niveles de multirresistencia en general en los aislados de los sedimentos que en los de las aguas, lo que podría estar relacionado por una parte con la menor movilidad de esta fase y con la acumulación de sustancias que puedan facilitar la adquisición de resistencias, por ejemplo por co-selección con resistencias a metales, o acumulación de bacterias resistentes que, al estar fijadas sobre el sedimento, podrían facilitar su contacto y aumentar la eficacia de la transferencia de genes de resistencia (Martínez y Baquero 2014). Por otro lado los niveles de resistencia mayores parecen corresponder a los aislados sobre medio nutritivo, minoritarios en su conjunto. Las razones de esta aparente acumulación de bacterias multirresistentes entre la cultivables en medio nutritivo son desconocidas, aunque podríamos considerar que, por una parte, la adaptación de bacterias habituadas a un ambiente salino a un ambiente con menor salinidad (el medio nutritivo) podría afectar a su susceptibilidad a antibióticos, y por otra, podría tratarse de bacterias procedentes de ambientes no salinos que al encontrarse en un medio salino

(la ría de Huelva) hayan desarrollado resistencias en su proceso de adaptación a ese ambiente, o adquisición de las mismas por co-selección de elementos genéticos de resistencia a metales (Bezverbnaya *et al.* 2005). Existen pocos estudios referentes a estos procesos de adaptación y a su efecto sobre la resistencia a antibióticos, pero en los realizados se han visto efectos de este último tipo (Lee *et al.* 2012, Yoon *et al.* 2013, Al-Nabulsi *et al.* 2015).

En cualquier caso, podemos afirmar que las bacterias resistentes a *Ap* aisladas de la Ría de Huelva presentan un alto índice de resistencia múltiple a antibióticos, con 96,4% de los aislados de la ría resistentes a 3 o más antibióticos (figura 10). Aunque la mayor parte de las resistencias de bacterias medioambientales podrían ser intrínsecas (Fajardo *et al.* 2008, Lupo *et al.* 2012), determinar el nivel de las que puedan ser transmisibles podría ayudar a determinar las posibilidades de diseminación de la resistencia a bacterias patógenas y constituir un riesgo para la salud de las personas y animales.

#### **5.3.1.1. Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según las zonas de muestreo y los medios de cultivo**

Los resultados recogidos en las tablas 11 y 12 muestran que la distribución de la resistencia a los distintos antibióticos no es aleatoria sino que para cada antibiótico existe una distribución distinta según la muestra o la fase y según los medios de cultivo.

Por lo general se observa una mayor proporción de aislados resistentes a cada antibiótico entre los obtenidos del sedimento que entre los de las muestras de aguas correspondientes de las dos zonas de muestreo, lo que podría reflejar la presencia de distinta diversidad de especies en ambas fases, o la existencia de algún factor que originase una acumulación de especies resistentes en los sedimentos tal como se ha discutido anteriormente. La resistencia más comúnmente encontrada entre los aislados de las fases líquidas de ambas zonas y para los del sedimento de la zona H1 fue a *Sm*, mientras que entre los del sedimento de la zona H2 fue a *Tm* y, muy de cerca, a *Nx* y a *Sm*. Por tanto en su conjunto la resistencia a *Sm* fue

la más común en el conjunto de aislados de la ría. Un alto número de aislados resistentes a *Ap* y a *Sm* se han descrito también en estudios de aguas de la costa oriental del mar Mediterráneo (Matyar 2012).

Al comparar los aislados procedentes de las fases equivalentes de las dos zonas de muestreo (tabla 11), no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de aislados resistentes a la mayoría de los antibióticos, siendo las diferencias mínimas. En el caso de las fases líquidas fueron ligeramente mayores en los de la zona H1 para ocho de los diez antibióticos, mientras que en los sedimentos ligeramente mayores en los de la zona H2 para siete de los diez antibióticos. Según esto, las actividades de las industrias tendrían poco impacto sobre los antibióticos concretos a los que los aislados de la ría de Huelva son resistentes, o bien que la contaminación por el aporte de metales pesados y otras sustancias a la ría procedentes de las industrias, y de antibióticos y bacterias procedentes de la EDAR se extiende por toda la ría debido a las mareas, homogeneizando toda la zona en cuanto a los determinantes de resistencia a antibióticos existentes, principalmente en las fases líquidas. No obstante se ha podido detectar una cierta diferencia en la composición en metales pesados entre los sedimentos de ambas zonas analizadas en contra de una homogeneización completa de la ría.

Analizando los porcentajes de aislados obtenidos sobre medio marino o nutritivo que son resistentes a antibióticos individuales (tabla 12) se observa que para seis de los antibióticos son mayores entre los de medio nutritivo, aunque las diferencias con los de medio marino son significativas solo en los casos de *Cc*, *Cz*, *Em*, *Tm* y *Vm*. Las mayores diferencias en porcentajes entre los dos medios se dan para *Tc* muy frecuente entre los de medio marino, y para *Em* más frecuente entre los de medio nutritivo. La resistencia más común entre los aislados en medio marino es a *Tc* y entre los de nutritivo a *Tm*. Un alto porcentaje de aislados resistentes a *Tc* también ha sido detectado en las aguas del mar Báltico (Moskot *et al.* 2012). Las posibles razones de la importante prevalencia de la resistencia a *Tc* en los aislados sobre medio marino ha sido discutida anteriormente (véase apartado 5.3.1.)

### 5.3.1.2. Biodiversidad de los aislados resistentes a ampicilina de la ría de Huelva

Las 8 clases filogenéticas encontradas en los aislados de la ría se hallaron tanto en la zona H1 como en la zona H2, aunque en diferentes proporciones. El movimiento de agua en la ría podría estar jugando un papel importante para la homogeneización de la composición bacteriana de ambas zonas haciendo que, a nivel de clase y de género, la mayoría de los aislados sean comunes en ambas, si bien no parece que el efecto de las mareas haya sido suficiente para homogeneizar completamente ambas zonas al haberse encontrado géneros distintos específicamente en una u otra zona. La composición filogenética a nivel de clase de los aislados *Ap<sup>r</sup>* que hemos aislado en nuestro estudio no difiere mucho de la diversidad del bacterioplancton detectada en otros estuarios o medios marinos (Selje *et al.* 2005, Jamieson *et al.* 2012, Du *et al.* 2013, Sjöstedt *et al.* 2014). Algunos estudios han analizado variaciones espacio-temporales en zonas costeras, observado que las temporales son importantes pero no las espaciales (Meziti *et al.* 2015), sin embargo en otros, si han sido detectadas diferencias entre zonas de estuario y río arriba (Hewson y Fuhrman 2004). Es complicado comparar los resultados de distintos estudios ya que numerosas variables son diferentes entre ellos y en muchos casos los niveles taxonómicos a los que se llegan son de bajo nivel (agrupación en OTUs sin identificación (Pommier *et al.* 2007), o clases (p.ej. Jamieson *et al.* 2012, Du *et al.* 2013)). La resolución que se tiene a nivel de clase puede no ser suficiente en algunos casos para detectar variaciones significativas. La diversidad de clases observada entre nuestros aislados en medio marino es algo mayor con respecto a la de los de nutritivo (figura 8B), lo que reflejaría, si dejamos aparte que el número de aislados en medio nutritivo es inferior, el origen esencialmente marino de las muestras. La diversidad de clases de bacterias observada en los aislados en medio nutritivo de la zona H2 es menor que en la zona H1, hecho que podría tener relación con la mayor influencia del mar que tiene la primera u la presencia diferencial de contaminantes en las dos zonas.

Los aislados de la ría se han asignado a 51 géneros (tabla 13), siendo la mayoría de ellos comunes a ambas zonas de muestreo y entre los cuales los más abundantes dentro de cada clase fueron: *Erythrobacter* (*Alphaproteobacteria*), *Bacillus* (*Bacilli*), *Pseudoalteromonas* (*Gammaproteobacteria*), *Microbacterium* (*Actinobacteria*), *Mesonía* (*Flavobacteriia*), *Achromobacter* (*Betaproteobacteria*), *Sphingobacterium* (*Sphingobacteriia*) y *Algoriphagus* (*Cytophagia*). En un estudio realizado sobre muestras de aguas profundas del mar Mediterráneo, en el que se han llegado a identificar por métodos metagenómicos algunos géneros (Zaballos *et al.* 2006), se han detectado secuencias mayoritarias pertenecientes al género *Erythrobacter*, en la clase mayoritaria *Alphaproteobacteria*, y al género *Pseudoalteromonas*, perteneciente a las gammaproteobacterias, sin embargo no se detectaron ninguno de los otros géneros detectados en nuestro estudio.

Entre las especies más representadas de los géneros más abundantes destacaron *Erythrobacter gangjinensis*, *Erythrobacter citreus* y *Erythrobacter vulgaris*, que fueron aislados de casi todas las muestras sobre medio marino y las dos primeras también de H2S-N. Entre las de los demás géneros más abundantes, destacaron por su abundancia *Bacillus galliciensis*, solo encontrada en H1L-M, *Pseudoalteromonas tetraodonis*, encontrada en H1S-M y H2L-M, *Microbacterium* sp., que se encontró en ambas zonas sobre medio marino y también sobre nutritivo en la zona H1, *Mesonía algae*, encontrada en las aguas de las dos zonas sobre medio marino, *Achromobacter xylosoxidans*, encontrada solo en el sedimento de la zona H1 sobre ambos medios de cultivo, *Sphingobacterium hotanense*, que se encontró solo sobre medio nutritivo a partir del sedimento de la zona H1 y de la fase líquida de la H2, y *Algoriphagus antarcticus*, encontrada sobre medio marino en las aguas de ambas zonas. Los porcentajes de identidad de las secuencias obtenidas con las de las de GenBank fueron en estas especies mayoritarias desde 97 a 100%, según el caso (tabla 14).

Podría parecer en principio curioso que bacterias como *E. coli* o los enterococos, relevantes como indicadores de contaminación fecal, no aparezcan entre nuestros aislados, teniendo en cuenta el vertido de la EDAR



de Huelva en la zona estudiada, sin embargo estas bacterias no parece que sean prevalentes en aguas residuales (revisado en Vaz-Moreira *et al.* 2014), y quizás las condiciones salinas y de contaminación por metales u otras sustancias tóxicas, harían desaparecer este tipo de bacterias en el ecosistema. En aguas residuales sin embargo son abundantes otro tipo de bacterias incluyendo proteobacterias (alfa-, beta- y gamma-) y miembros del género *Bacillus*, en los cuales recientemente se ha demostrado que existen plásmidos relevantes como vectores de transmisión de resistencias a *Tc* o macrólidos (como *Em*) y de genes responsables de la multirresistencia a drogas en estos ambientes (Zhang *et al.* 2011) que pudieran haber influido en los niveles de resistentes en la ría.

Algunas de las especies identificadas se han descrito como patógenos humanos, en la mayoría de los casos patógenos poco frecuentes, o de peces o aves (tabla 31). Aunque en la mayor parte de las especies solo se han descrito algunos casos de infecciones oportunistas, en ocasiones éstas han llegado a producir sepsis. La presencia de estas especies multirresistentes en la ría podría ser relevante desde el punto de vista de la salud pública, la acuicultura y la protección de la fauna avícola, de forma directa, por infección, o indirecta por el carácter multirresistente a antibióticos de estas especies en el caso de que todas o algunas de estas resistencias pudieran ser transmisibles a otras bacterias patógenas.

**Tabla 31.** Posible patogenicidad de las especies encontradas en la ría de Huelva, según la literatura. + descrita como patógena, -No descrita como patógena, +n, n artículos de patogenicidad, p, patógena en peces, a, patógeno en aves, +/- según especie indicada, o unas especies si y otras no.

Especie	Nº ais.	Patog.	Ref.
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2	+	Turel <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus cereus</i>	1	+	Logan (2012)
<i>Bacillus</i>	4	+	Logan (2012)
<i>Bacillus licheniformis</i>	3	+1	Jeon <i>et al.</i> (2012)
<i>Brevundimonas diminuta</i>	5	+	Lu <i>et al.</i> (2013)
<i>Brevundimonas vesicularis/olei</i>	5	+/-	Gupta <i>et al.</i> (2014)
<i>Cellulosimicrobium</i>	6	+1/	Magro-Checa <i>et al.</i> (2011), Petkar <i>et al.</i>
<i>Chitinophaga terrae/</i>	1	+1/-	Crémet <i>et al.</i> (2009)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	3	+1	Wenzler <i>et al.</i> (2015)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1	+1	Wenzler <i>et al.</i> (2015)
<i>Methylobacterium</i> sp.	1	+/-	Kovaleva <i>et al.</i> (2014)
<i>Microbacterium</i> sp.	18	+/-	Buss <i>et al.</i> (2014)
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1	+1,	Kamijo <i>et al.</i> (2012), Liu <i>et al.</i> (2013)
<i>Neisseria</i> sp.	1	+/-	Liu <i>et al.</i> (2015)
<i>Ochrobactrum</i>	2	+/+	Mudshingkar <i>et al.</i> 2013, Chai <i>et al.</i> (2015)
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	1	+	Chai <i>et al.</i> (2015)
<i>Ochrobactrum</i>	1	-/+	Mudshingkar <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	+	Nseir <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	4	+1	Hage <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudomonas putida</i>	1	+	Kim <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	+3	Campos-Herrero <i>et al.</i> (1997), Bello 2007
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4	+	Sumida <i>et al.</i> (2015)
<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	4	+p	Piñeiro-Vidal <i>et al.</i> (2008)
<i>Tsukamurella incheonensis</i>	1	+	Ochi <i>et al.</i> (2015)

Considerando las muestras en su totalidad y las zonas H1 y H2 por separado, los valores de los índices de biodiversidad (tabla 15) indican una elevada biodiversidad a nivel de especie entre los aislados seleccionados, que es mayor entre los aislados en medio marino y entre los obtenidos de las fases líquidas. Este último dato podría estar relacionado con la cantidad de aislados seleccionados de una fase u otra, lo cual influiría directa o indirectamente en los cálculos de los índices de biodiversidad realizados (Moreno 2001). De esta forma, podemos afirmar que existe una considerable diversidad a nivel de especie entre las bacterias resistentes a Ap seleccionadas de la ría.

#### 5.3.1.3. Distribución de la resistencia a los antibióticos entre los aislados asignados filogenéticamente

El análisis de la distribución de aislados según su género en relación a sus perfiles de resistencia, muestra como un porcentaje elevado de los

aislados ( $\geq 90\%$ ) de distintos géneros es resistente a uno o más antibióticos (Figuras 12 y 13).

La resistencia intrínseca es en algunos géneros y especies la forma más común de resistencia, incluyéndose en este concepto las resistencias debidas a genes cromosomales y las debidas a bombas de eflujo específicas o no específicas (Alvarez-Ortega *et al.* 2011, Cox y Wright 2013), las cuales, en algunos casos, pueden estar codificadas o controladas por elementos genéticos transmisibles (Jiang *et al.* 2015, Hooper y Jacoby 2015). Se considera que si la resistencia es intrínseca debe mostrarse en todos (Walsh y Duffy 2013), o casi todos los miembros del grupo al que se asigna. Algunas de estas resistencias pueden, sin embargo, aparecer o desaparecer en algunos miembros del mismo género por mutaciones (Vaz-Moreira *et al.* 2014). Por esta razón hemos considerado una resistencia intrínseca aquella que se observa en un porcentaje  $\geq 90\%$  de los aislados.

Para determinar este carácter, se han considerado agrupaciones por géneros, pero solo se han tenido en cuenta aquellos de los se disponía de al menos ocho aislados, con el fin de que la adscripción estuviera sustentada por un número significativo de estos. No se consideraron dentro de cada zona de muestreo, fases o medios de aislamiento ya que no se tendría representación suficiente de muchos de los géneros en estos subgrupos de aislados. Por la misma razón no se consideraron análisis a nivel de especie. Con este criterio, se analizaron catorce géneros y se determinó que, solo cuatro no mostraron resistencia intrínseca a ningún antibiótico: *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudoalteromonas* y *Pseudomonas* (figura 12). El caso de *Pseudomonas* es curioso ya que, el hecho de no aparecer como intrínsecamente resistente a ningún antibiótico contrasta con la consideración generalmente aceptada de que miembros de este género presentan resistencias que, en su mayoría, serían intrínsecas, sobre todo en el caso de la especie patógena *P. aeruginosa* (Fajardo *et al.* 2008, Alvarez-Ortega *et al.* 2011), aunque esta especie concreta no ha sido aislada de la ría. La comparación en el carácter intrínseco de la resistencia a ciertos antibióticos entre bacterias de origen ambiental y clínico muestra algunas discrepancias (Walsh y Duffy 2013). En concreto para las Pseudomonadales

se encuentra discrepancia en la resistencia a *Tc*, entre otros. Mientras que los aislados de suelo muestran ser intrínsecamente resistentes a *Tc*, no lo son los de origen clínico, ni, como hemos indicado, los aislados por nosotros. Los aislados del género *Bacillus* de la ría se muestran mayoritariamente resistentes a *Tm* al igual que los de suelo (Walsh y Duffy 2013) del orden Bacillales, pero no los de origen clínico. Estos últimos se consideran también intrínsecamente resistentes a *Vm*, pero no los de suelo, ni los de la ría. Estos resultados están de acuerdo con las conclusiones de Walsh y Duffy quienes sugieren que el desarrollo de resistencias intrínsecas puede haber ido por líneas diferentes en distintos ambientes, incluyendo los clínicos.

Analizando la prevalencia de la resistencia a cada antibiótico entre los géneros (figura 13), observamos que los niveles de aislados resistentes a *Cc* o *Rp* son, salvo alguna excepción, bajos. Para los demás antibióticos aparecen en general al menos un género en el que la resistencia está muy extendida, con la mayoría de los antibióticos mostrando una falta de efecto sobre un número de géneros importante, con el máximo para *Sm* con siete géneros. La falta de aislados resistentes a *Cc* podría deberse a un uso muy limitado de su aplicación clínica en los países desarrollados debido a su toxicidad, y por ello la existencia de una baja presión selectiva de este antibiótico en el medio ambiente, pero también en bacterias de origen clínico, lo que está haciendo plantearse su reintroducción en la farmacopea para determinados casos (Mir y Abbas 2010). Se ha descrito que la resistencia a *Rp* en las bacterias patógenas conlleva un elevado coste en el *fitness* de la bacteria, quizás esta pueda ser una razón por la que en ambientes en los que la ausencia del antibiótico no justifica el gasto, estos genes de resistencia podrían ser escasos (Hall *et al.* 2011).

Aunque la transmisibilidad de los genes responsables de las resistencias intrínsecas se supone que no pueden ocurrir, al menos con alta frecuencia, no debemos considerarlo imposible (Vaz-Moreira *et al.* 2014), ya que es concebible que pudieran llegar a ser transmisibles dependiendo de su mecanismo y la existencia de elementos genéticos que las pudieran transportar. No obstante, con un criterio conservador, podríamos considerar las resistencias que no aparecen como intrínsecas con mayor probabilidad

de poder ser transmitidas ya que serían resistencias adquiridas y, en algunos casos, posiblemente transmisibles por estar codificadas en elementos genéticos móviles. La adquisición de este tipo de resistencias podría ser debida a mutaciones y selección de los genes mutados o a la adquisición de materiales genéticos procedentes de otras bacterias resistentes, mediante mecanismos de transferencia horizontal de genes. La existencia entre nuestros aislados de un considerable nivel de resistencias que pudieran ser de este tipo (principalmente a *Tm*, *Sm* o *Nx*) hace pensar en que, si estos determinantes estuviesen en elementos móviles, podrían actuar como focos de difusión de dichas resistencias. En estudios futuros se estudiará la presencia en los aislados disponibles de elementos como integrones o plásmidos que pudieran intervenir en la acumulación y difusión de éstas.

#### **5.3.1.4. Asociación de las resistencias a dos antibióticos según los géneros**

Los resultados de los estudios de concordancia (tabla 16) en la resistencia no intrínseca simultánea a dos antibióticos, considerando todas las bacterias aisladas de la ría, muestran en general valores bajos del índice kappa, con un grado de concordancia apenas moderado para algunas parejas. Esto sugiere que, aunque existe cierta probabilidad, esta es baja de que los determinantes de estas parejas de resistencias estén asociados y se transmitan conjuntamente. Al estar considerando aislados de toda la ría en conjunto, para que apareciesen concordancias buenas, deberían haberse homogenizado en la población con transferencia de elementos genéticos muy promiscuos, ya que la diversidad de bacterias es elevada.

Por el contrario, analizando las concordancias dentro de cada género (tabla 16) , se observó un gran número de concordancias buenas y muy buenas principalmente entre los aislados dentro de cada uno de los géneros: indicando que los antibióticos asociados en cada pareja podrían estar compartiendo mecanismos de resistencia o que en estos aislados los genes de resistencia a estos antibióticos estarían ubicados en un mismo elemento genético transferible entre los miembros del género concreto en el que se han encontrado. Puesto que los mecanismos de acción conocidos de los antibióticos que forman las parejas de máxima concordancia no parecen ser

comunes, deberíamos considerar como probable la existencia de elementos genéticos móviles que contengan conjuntamente los determinantes responsables de las resistencias o la existencia de sistemas de entrada-expulsión comunes a los antibióticos de cada pareja asociada en cada género. En particular en los aislados del género *Paenibacillus* un elevado número de concordancias podrían sugerir la existencia de un elemento genético transferible entre especies de este género que contuviera varios genes de resistencia a distintos antibióticos, tal vez formando parte de un integrón, o bien varios elementos compatibles con distintas agrupaciones de genes de resistencia. Se han descrito aislados del género *Paenibacillus* multirresistentes debido a la presencia de varios genes de resistencia a diferentes antibióticos en un único elemento móvil (Patel *et al.* 2000, Guardabassi *et al.* 2004, Pednekar *et al.* 2010, Soundarapandian *et al.* 2013), y se ha conseguido la transformación de *E. coli* con uno de estos plásmidos con genes de resistencia para once antibióticos, confiriéndole a esta bacteria resistencia a los antibióticos probados (Soundarapandian *et al.* 2013). La disponibilidad de los aislados permitirá analizar en el futuro la existencia de tales elementos genéticos y los determinantes de resistencia que portan, así como las posibilidades de transferencia de los mismos.

### 5.3.2. Chorrera de Despeñalagua

Se siguió el mismo procedimiento descrito para el aislamiento de bacterias resistentes a *Ap* de la ría de Huelva, aunque en el sistema de la Chorrera de Despeñalagua la diversidad fenotípica de las colonias encontradas fue inferior.

Se aislaron un mayor número de bacterias sobre medio nutritivo (56,6%) que sobre medio marino. La abundancia de bacterias capaces de crecer en medio marino a partir de muestras con baja concentración salina es cuanto menos llamativa, ya que las concentraciones salinas de las muestras fueron bajas, correspondiendo a un sistema de agua dulce. El mayor número de bacterias aisladas sobre medio marino procedieron de la zona G2.

Se utilizó la misma aproximación descrita para la ría de Huelva a la hora de aislar las bacterias resistentes a *Ap* y los aislados se caracterizaron

de igual forma, determinándose los perfiles de resistencia a los otros 10 antibióticos y encontrándose 92 perfiles en este caso (anexo 2), lo que indica una alta diversidad en la resistencia a los antibióticos entre los aislados seleccionados, aunque ésta es inferior a la observada en la ría de Huelva con 143 perfiles. Esto podría estar relacionado con la naturaleza poco contaminada o cuasi prístina del sistema de la Chorrera de Despeñalagua, con posiblemente menor presencia de tóxicos, antibióticos y metales pesados, que pudieran ejercer presión selectiva de bacterias resistentes. Otro factor a tener en cuenta sería la menor diversidad filogenética a nivel de especie detectada entre los aislados de este ecosistema con predominio de las del género *Pseudomonas*.

Se determinó igualmente el valor del índice MAR de los aislados individualmente y considerando distintos grupos según procedencia y medios de aislamiento (figura 15, tabla 18). Los índices MAR más frecuentes, considerando todos los aislados de la Chorrera, fueron relativamente bajos, correspondiendo a la resistencia a seis de los once antibióticos utilizados. Sin embargo se determinó un valor promedio de resistencia equivalente a la de siete de los antibióticos. Estos datos indicarían un nivel de multirresistencia similar al de la ría de Huelva pero una distribución más homogénea de la multirresistencia de los aislados y una frecuencia más baja de aislados con altos niveles de ésta. Los índices MAR indicarían un mayor nivel de multirresistencia entre los aislados sobre medio marino con una alta frecuencia de aislados en este medio con resistencia a ocho (moda 0,73) o a nueve (moda 0,82) de los antibióticos usados, y valores promedio de resistencia a ocho antibióticos (mediana 0,73). Es curioso que en este sistema, al igual que ocurría con el de la ría de Huelva, los mayores niveles de multirresistencia se observen para un grupo de aislados, en este caso los obtenidos sobre medio marino, que son minoritarios en el sistema de la Chorrera, un sistema de agua dulce. Las posibles razones de este efecto ya han sido discutidas en el caso del análisis de los resultados de las muestras de la ría de Huelva. En este caso la adaptación de bacterias de un medio de bajo contenido salino a otro de mayor salinidad estaría apoyado por algunos estudios publicados en los que lo que la adaptación de bacterias a

condiciones de mayor osmolaridad supone una disminución de la susceptibilidad de las mismas a distintos antibióticos. Estos estudios realizados principalmente sobre bacterias patógenas podrían indicar cambios en la expresión génica que podrían ser en algunos casos permanentes (véase apartado 5.2.1.). Si este efecto se produce también en bacterias ambientales diversas está aún por determinar y esta hipótesis podrá ser analizada en el futuro al disponer de los aislados que manifiestan en su conjunto este fenómeno.

Aunque el índice MAR se suele usar como un indicador del nivel de multirresistencia (Paul et al. 1997, Riaz y Bashir 2015), puede verse afectado por el empleo en su cálculo de diferentes número y tipo de antibióticos, distintas concentraciones de éstos o por el empleo de diferentes métodos de determinación de la resistencia, por lo que su comparación entre distintos estudios debe hacerse con cierta precaución. Solo manteniendo constantes esos parámetros su comparación es completamente pertinente. No obstante hemos querido revisar otros estudios en los que dicho parámetro se ha determinado. Consideraremos el valor de la mediana del índice MAR de los aislados de la Chorrera que fue 0,64 (resistencia a siete de once antibióticos) como el representativo de los aislados de este ecosistema.

En el estudio de Voolaid y cols. (2012), para el conjunto de aislados de un río no contaminado, se determinó un valor del índice MAR de 0,50 (diez antibióticos probados). En otro estudio similar, llevado a cabo sobre lagos oligotróficos de Brasil, con distintos niveles de influencia antropogénica, el promedio de éste índice MAR fue de 0,52 (nueve antibióticos probados) (Pontes *et al.* 2009). Ya que el 51,1% de los aislados de la Chorrera identificados son del género *Pseudomonas* (tabla 22), y que bacterias de este género son consideradas como altamente multirresistentes (Li *et al.* 1994, Poole 2011), se ha calculado la mediana del índice MAR considerando solo este género y resultó ser de 0,64, con valores individuales de los aislados en el rango 0,20-1,00. Excluyendo el género *Pseudomonas*, el índice MAR promedio de los aislados identificados sería de 0,55. Efectivamente esto nos indica que los miembros de este género muestran niveles de multirresistencia mayor que el resto y su presencia entre los aislados hace subir el valor de



índice MAR promedio global, indicando un menor nivel de multirresistencia entre los aislados de la Chorrera con respecto a los de la ría, si no tenemos en cuenta el género *Pseudomonas* altamente resistente. Blasco y cols. (2008) analizaron aislados del género *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*) de ambientes no contaminados con antibióticos, y describieron un índice MAR (23 antibióticos probados) algo superior a 0,50 con valores individuales de 0,30-0,70, lo que aparentemente indicaría un cierto nivel superior de multirresistencia en las *Pseudomonas* encontradas en la Chorrera de Despeñalagua, aunque el índice MAR descrito por Blasco y cols. corresponde a la resistencia a más de once antibióticos por término medio y, por tanto, estas *Pseudomonas*, todas ellas identificadas como *P. aeruginosa*, serían en realidad mucho más multirresistentes que las de la Chorrera de Despeñalagua.

#### **5.3.2.1. Análisis estadístico de la distribución de los aislados resistentes a cada antibiótico según las zonas de muestreo y los medios de cultivo**

Los resultados obtenidos indican una resistencia diferencial de los aislados de las dos zonas muestreadas a algunos de los antibióticos empleados (tabla 19). Esto podría estar relacionado con la existencia de poblaciones filogenéticamente diferentes entre los aislados a partir de una u otra zona, con resistencias intrínsecas diferentes, con la acumulación de elementos genéticos responsables de las resistencias a estos antibióticos específicamente en uno u otro ambiente o con que la proporción de aislados de cada zona obtenidos sobre medio marino o nutritivo es diferente y hay un efecto del medio sobre la resistencia detectada. El hecho de haber encontrado un número de perfiles de resistencia mayor en G2 que en G1 y en el caso de G2, un número mayor entre los aislados sobre medio marino que entre los de nutritivo, podría ser la causa de la agrupación de la resistencia a ciertos antibióticos de forma preferente en una u otra zona. En este sentido también la distribución de resistencias según el medio de aislamiento muestra algunas diferencias (tabla 20). El que las diferencias en porcentajes de aislados resistentes a *Nx* y *Tc* entre los de medio nutritivo y marino, en favor de este último, se observe también entre G1 y G2, en favor

de esta última, puede deberse a la predominancia de los aislados en medio marino entre los de G2 (véase apartado 4.2.4.1), aunque las diferencias observadas son mucho mayores entre los medios que entre las muestras. Aunque la diferencia en porcentaje de aislados es inferior, también es significativa la detectada para la resistencia a *Tm* en favor de los de medio marino, y también en este caso correlaciona con una diferencia significativa de la misma resistencia entre los procedentes de G1 y G2, en favor de esta última. Igualmente sucede si consideramos aquellas resistencias con diferencias estadísticamente significativas en porcentaje de aislados en favor de los de medio nutritivo y en favor de los de la zona G1, como es el caso de las resistencias a *Cc*, *Em*, o *Sm*. Las resistencias a *Rp* o a *Vm* también aparecen en mayor porcentaje en nutritivo y en G1. Sin embargo, algunas resistencias no muestran diferencias que se puedan correlacionar entre medios y muestras, así la resistencia a *Cz*, significativamente más frecuente entre los aislados sobre nutritivo que entre los de marino, es algo más frecuente entre los de G2 que entre los de G1. Estos datos sugieren que, aunque con alguna excepción, las diferencias observadas en cuanto a la prevalencia de las resistencias a los antibióticos entre los aislados de las zonas de muestreo, se deben a la distinta representación entre los aislados de ambas zonas de los obtenidos sobre uno u otro medio, y por tanto posiblemente no es una diferencia real entre los aislados según las zonas, sino una diferencia entre las resistencias mostradas por los aislados según el medio en que fueron obtenidos, sea ésta debida a una biodiversidad diferencial o a otras causas.

#### **5.3.2.2. Biodiversidad de los aislados resistentes a ampicilina de la Chorrera de Despeñalagua**

La distribución de los aislados por clases, mostró una alta prevalencia de los de la clase *Gammaproteobacteria* (figura 16), siendo la siguiente clase más abundante *Alphaproteobacteria* entre los de la zona G1 y *Bacilli* entre los de la zona G2. Entre los procedentes de la zona G1 hubo más diferencia en la representación de clases entre los aislados sobre uno u otro medio de cultivo. En conjunto los géneros más representados entre las clases más

abundantes fueron *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria), *Bacillus* (Bacilli) y *Phyllobacterium* (Alphaproteobacteria) (tabla 21).

Considerando todos los aislados de la Chorrera de Despeñalagua, la distribución a nivel de clase difiere de la descrita para los lagos oligotróficos de Brasil estudiados por Pontes y cols. (2009), aunque la mayoritaria fue la clase Gammaproteobacteria, con porcentajes elevados, 89% en el estudio de Pontes y cols. y casi 78% en nuestro estudio (tabla 21). La distribución de los demás aislados fue diferente perteneciendo a clases que aparecieron en nuestro estudio y que no estaban representadas en el de Pontes y cols., como Bacilli y Alphaproteobacteria. A nivel de género, cinco de los veinte que encontramos en la Chorrera de Despeñalagua son comunes a los detectados por Pontes y cols., *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* y *Enterobacter*, aunque la distribución de éstos dentro de cada clase difiere considerablemente, siendo especialmente notorio el menor porcentaje de miembros del género *Pseudomonas* entre las gammaproteobacterias, un 13,2%, frente a las encontradas por nosotros, un 65,8%. En el estudio mencionado se detectaron catorce géneros, y por tanto menor diversidad que la analizada en nuestro caso.

En el estudio publicado por Blasco y cols. (2008) se seleccionaron y estudiaron bacterias de solo tres géneros potencialmente patógenos incluyendo *Aeromonas* y *Pseudomonas*, mediante el empleo de placas con medios selectivos, por lo que no podemos comparar la diversidad de nuestros aislados con la de este estudio, aunque entre nuestros aislados se han encontrado miembros de los dos géneros indicados. A nivel de especie, los 60 aislados obtenidos por estos investigadores fueron identificadas como *P. aeruginosa*, lo cual es sorprendente en vista de la diversidad de especies detectadas por nosotros. Quizás el empleo de medios selectivos haya dado lugar a un sesgo en las especies detectadas por estos autores, aunque ciertamente esta especie es la más asociada habitualmente con patogenicidad, y estas bacterias eran las de interés en su estudio.

Por último, en el trabajo de Voolaid y cols. (2012) se encontraron mayoritariamente bacterias de la clase Gammaproteobacteria, con un 58% de los representantes de esta clase del género *Pseudomonas*. Este resultado

concuenda con el obtenido en nuestro estudio en cuanto a una elevada población de bacterias de este género. En su conjunto los aislados del río Emajõgi (Estonia) fueron más diversos (9 clases, 59 géneros) que los nuestros, lo que puede estar relacionado con el análisis de un número mayor de aislados (760) que en nuestro estudio. Habría que señalar aquí que los aislados obtenidos por este grupo fueron seleccionados específicamente por su resistencia a cada uno de los cinco antibióticos empleados en el estudio (*Ap*, *Cc*, *Km*, norfloxacino y *Tc*).

La especie más frecuentemente encontrada entre los aislados del género *Pseudomonas* (tabla 22) fue, *P. fluorescens*, aunque un gran número de los aislados de este género no pudieron ser asignados a una especie concreta, ni siquiera cuando se utilizó la secuencia del gen del factor  $\sigma 70$  (*rpoD*) (tabla 23), propuesta por algunos autores como de utilidad en estudios filogenéticos en este género (Mulet *et al.* 2009, Sánchez *et al.* 2014). Tampoco en el caso del género *Bacillus* la secuencia de los genes de ARNr 16S permitió identificar la mayor parte de los aislados, al tener cada secuencia una elevada similitud con las de varias especies de este género. Todos los aislados del género *Phyllobacterium*, mayoritario entre la clase *Alphaproteobacteria*, fueron de la especie *P. myrsinacearum*.

Cepas de algunas de las especies identificadas han sido involucradas en procesos patogénicos en humanos, peces, plantas y hongos de interés comercial (tabla 32). Ciertas especies se han encontrado en unos pocos casos mientras que otras, como las de los géneros *Aeromonas*, y *Pseudomonas* y algunas especies concretas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Stenotrophomonas maltophilia* son patógenos frecuentes produciendo infecciones graves (véanse refs. En tabla 32).

**Tabla 32.** Posible patogenicidad de las especies encontradas en la Chorrera de Despeñalagua, según la literatura. + descrita como patógena, -No descrita como patógena, +1, un solo caso descrito, p, patógena en peces, pl, patógena en plantas, h, patógena de hongos +/- según especie indicada, o unas especies si y otras no. B.c.: *B. cereus*, B.a.: *B. anthracis*

Especie	Nº ais.	Patog.	Ref.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	+	Janda y Abbott (2010)
<i>Aeromonas popofii</i>	7	+	Janda y Abbott (2010)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	5	+p	Janda y Abbott (2010)
<i>Budvicia aquatica</i>	2	+1	Corbin <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus</i> sp.	20	+B.c.,	Logan (2012)
<i>Chromobacterium</i>	1	+	Okada <i>et al.</i> (2013), Takenaka <i>et al.</i> (2015)
<i>Enterobacter</i> sp.	1	+	Chen <i>et al.</i> (2015b)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	+	Hagiya <i>et al.</i> (2015), Vergara-López <i>et al.</i>
<i>Microbacterium</i> sp.	2	+	Buss <i>et al.</i> (2014)
<i>Neisseria</i> sp.	1	+/-	Liu <i>et al.</i> (2015)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	+	Oliver <i>et al.</i> (2015)
<i>Pseudomonas baetica</i>	1	+p	López <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas</i>	1	+p/-	Oliver <i>et al.</i> (2015)
<i>Pseudomonas corrugata</i>	6	+pl	Strano <i>et al.</i> (2015)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	20	+	Scales <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudomonas</i>	1	+/-	Scales <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudomonas</i>	1	+/+1	Scales <i>et al.</i> (2014), Cheuk <i>et al.</i> (2000)
<i>Pseudomonas</i>	1	-/+pl	Goto (1983)
<i>Pseudomonas putida</i>	1	+	Kim <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas salomonii</i>	4	+pl	Gardan <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	9	+h	Chung <i>et al.</i> (2014)
<i>Pseudomonas veronii</i>	6	+1	Cheuk <i>et al.</i> (2000)
<i>Rahnella aquatilis</i>	5	+	Kuzdan <i>et al.</i> (2015)
<i>Serratia marcescens</i>	3	+	Majumdar y Crum-Cianflone (2015)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	+	Sumida <i>et al.</i> (2015)

La biodiversidad de los aislados filogenéticamente asignados obtenidos de la Chorrera de Despeñalagua (tabla 24) es inferior a la observada en los de la ría de Huelva, aunque en términos absolutos debemos considerarla como una diversidad elevada (véase apartado 3.7.3). La zona G1 parece ser algo más diversa en cuanto a especies, aunque con un menor número de perfiles de resistencia, que la zona G2, lo que podría indicar una mayor incidencia de mecanismos de transferencia horizontal de genes de resistencia que homogenicen estos perfiles. Los aislados sobre medio nutritivo son más diversos a nivel de especie que los procedentes de marino, reflejando la naturaleza no salina del ecosistema, al igual que en la ría de Huelva ocurría lo contrario al tratarse de un ecosistema esencialmente marino. Si consideramos en cada zona los aislados en uno u otro medio, en la zona G1 la diversidad es mayor entre los procedentes de medio nutritivo

que entre los de marino, relación que también se observa en la diversidad de perfiles de resistencia. En la zona G2, la diversidad parece ser similar entre los aislados procedentes de uno u otro medio, a pesar de que el porcentaje de aislados de esta zona sobre medio nutritivo fue mucho menor y también lo fue el número de perfiles de resistencia encontrados.

### **5.3.2.3. Distribución de la resistencia a los antibióticos entre los aislados asignados filogenéticamente**

La resistencia de los aislados a los distintos antibióticos mostró porcentajes de resistentes que llegaban a ser, en algunos casos, de más del 90% de los de casi todos los géneros analizados (véase apartado 4.2.4.5) (figuras 17 y 18), y por tanto fueron consideradas como intrínsecas.

Para el género *Aeromonas* no se observó ninguna resistencia de este tipo (figura 17) y tampoco fue observada en los estudios de Blasco y cols. (2008), Pontes y cols. (2009) y Voolaid y cols. (2012), para ninguno de los antibióticos usados. En el estudio de Walsh y Duffy (2013), en el que se analizaron aislados de suelos, encontraron algunas bacterias del orden Aeromonadales intrínsecamente resistentes a varios antibióticos y entre ellos a *Rp*, *Tm*, *Vm*, pero no a *Cc* o *Tc*, aunque las de ambientes clínicos no lo son para *Tm* o *Vm* (tabla 33).

El género *Bacillus* fue intrínsecamente resistente a *Cz* y *Tm* (tabla 17), compartiendo este carácter para *Tm* con los aislados de este género de la ría de Huelva. Entre los de la ría el número de los resistentes a *Cz* fue también elevado aunque la resistencia no podía ser considerada intrínseca (figura 12). En la mayor parte de estudios sobre muestras de aguas no se ha descrito la presencia de bacterias del género *Bacillus* (Blasco *et al.* 2008, Pontes *et al.* 2009, Voolaid *et al.* 2012), pero sí en el estudio de suelos de Walsh y Duffy en 2013 (tabla 33). En este caso se describió la presencia de bacterias del orden Bacillales con resistencia intrínseca a *Cc*, *Rp*, *Tm* y *Vm*, pero no a *Tc*, compartiendo con miembros del género *Bacillus* aislados por nosotros el carácter intrínseco de la resistencia a *Tm* y el no intrínseco de la correspondiente a *Tc*. En bacterias de origen clínico se describe como intrínseca la resistencia a *Vm*, mostrando de nuevo diferencias dependientes del origen de las bacterias ambientales de agua o suelos y clínicas.

El género *Pseudomonas* se mostró intrínsecamente resistente a *Tm* y *Vm* (figura 17), no coincidiendo con lo encontrado en el de la ría de Huelva, que no mostró ninguna resistencia intrínseca. En el estudio de Blasco y cols. (2008) se aislaron miembros de este género, observándose diferencias en los porcentajes de aislados resistentes a diversos antibióticos, incluyendo diferencias notables entre las distintas torres de refrigeración muestreadas. Las *Pseudomonas* spp. obtenidas de los embalses fueron intrínsecamente resistentes a *Em*, *Nx* y *Vm* entre otros, mientras que las de las torres de refrigeración lo fueron a *Nx* en todos los casos, y a *Vm* en alguna de las muestras. Ni los aislados de embalses ni los de las torres de refrigeración fueron intrínsecamente resistentes a *Cc*, *Cz*, *Km* y *Rp*. En este estudio no se utilizó *Tm*. En el estudio de Pontes y cols. (2009) no se usaron *Tm* ni *Vm* y, entre los usados, se mostraron intrínsecamente resistentes a *Ap*, *Cc* y *Nx*, pero no a *Tc*. Entre las bacterias de este género aisladas por Voolaid y cols. (2012), no se observaron resistencias intrínsecas a ninguno de los antibióticos que probaron incluyendo *Ap*, *Cc*, *Km*, y *Tc*. No se emplearon los antibióticos *Tm* ni *Vm*. La resistencia a *Ap* fue la más frecuente, pero solo un porcentaje alrededor del 80% fueron resistentes. Finalmente en el estudio sobre muestras de suelos realizado por Walsh y Duffy (2013), las resistencias de las bacterias del orden Pseudomonadales a *Cc*, *Rp*, *Tc*, *Tm* y *Vm*, fueron consideradas intrínsecas. De estas, las correspondientes a *Cc* y *Tc* no fueron consideradas como intrínsecas entre miembros de este género procedentes de ambientes clínicos. En este caso, los aislados de este género obtenidos por nosotros se parecerían a los de suelos y a los de origen clínico en su resistencia intrínseca a *Tm* y *Vm*, aunque no en el carácter intrínseco de las resistencias a *Cc*, *Rp* y *Tc* de los de suelos y a *Rp* de los clínicos (tabla 33).

Los aislados del género *Serratia* obtenidos de la Chorrera se mostraron como intrínsecamente resistentes a *Em*, *Rp* y *Vm* (figura 17). Este género no fue encontrado en la ría de Huelva, ni fue seleccionado para su análisis en el estudio de Blasco y cols. (2008), y tampoco ha sido descrito en el estudio de Voolaid *et al.* (2012). Solo dos aislados de este género fueron estudiados por Pontes y cols. (2009) y no mostraron resistencia intrínseca a ninguno de los antibióticos probados. En el artículo de Walsh y Duffy (2013)

sí que aislaron bacterias de este género, aunque no indican cuantas. Estos autores describen que las bacterias del orden Enterobacterales, entre las que se incluyen un 78% de aislados de este género, fueron intrínsecamente resistentes a *Tm*, *Tc*, *Rp* y *Vm*, además de a otros. No lo fueron a *Cc*, y *Em* no fue probada. Estos datos son parecidos a los encontrados en nuestro estudio ya que la resistencia a *Rp* y *Vm* es compartida y, entre nuestros aislados, la resistencia a *Tm* solo la presentaron un 87,1% de los de este género, pero fue intrínseca también en el género *Rahnella* (del mismo orden), que así mismo comparte el carácter intrínseco de la resistencia a *Rp* y *Vm*, aunque no a *Em*. La principal diferencia sería la resistencia a *Tc*. La resistencia de cepas clínicas de este orden es intrínseca a *Rp* y *Vm*, pero no a *Tm*, *Tc* o *Cc*, mostrando una concordancia entre cepas clínicas, del suelo y de las aguas estudiadas por nosotros en cuanto al carácter intrínseco de la resistencia a *Rp* y *Vm*, siendo o no resistentes intrínsecos a *Tm* o *Tc* según su origen y no siéndolo en cualquiera de los casos estudiados a *Cc* (tabla 33).

Tabla 33. Comparación de las resistencias intrínsecas de género u orden encontradas en la ría de Huelva, en la Chorrera de Despeñalagua y en la bibliografía. N.E. género no encontrado, N.A. género no analizada, - resistencia intrínseca no detectada, Sedim.: sedimento, (CD)-Chorrera de Despeñalagua, (RH), ría de Huelva, (AD), muestras de agua dulce, (S) muestras de suelos, (C) muestras clínicas

Estudio o referencia	Tipo de muestra (Abrev.)	Aero	Baci	Género Psdo	Rahn	Serr
Chorrera de Despeñalagua	Agua dulce (CD)	-	Cz, <i>Tm</i>	<i>Tm</i> , <i>Vm</i>	<i>Rp</i> , <i>Tm</i> , <i>Vm</i>	<i>Em</i> , <i>Rp</i> , <i>Vm</i>
Ría de Huelva	Agua salada/ Sedim. (RH)	N.E.	<i>Tm</i>	-	N.E.	N.E.
Blasco <i>et al.</i> 2008	Agua dulce (AD1)	-	N.A.	<i>Em</i> , <i>Nx</i> , <i>Vm</i>	N.A.	N.A.
Pontes <i>et al.</i> 2009	Agua dulce (AD2)	-	N.E.	<i>Cc</i> , <i>Nx</i>	N.E.	-
Voolaid <i>et al.</i> 2012	Agua dulce (AD3)	-	N.E.	-	N.E.	N.E.
Walsh y Duffy 2013	Suelos (S)	<i>Rp</i> , <i>Tm</i> , <i>Vm</i>	<i>Cc</i> , <i>Rp</i> , <i>Tm</i> , <i>Vm</i>	<i>Cc</i> , <i>Rp</i> , <i>Tc</i> , <i>Tm</i> , <i>Vm</i>	<i>Rp</i> , <i>Tc</i> , <i>Tm</i> , <i>Vm</i>	
Referido en Walsh y Duffy 2013	Clínicas (C)	<i>Rp</i>	<i>Vm</i>	<i>Cc</i> , <i>Rp</i> , <i>Tm</i> , <i>Vm</i>	<i>Rp</i> , <i>Vm</i>	
Coincidencias		<i>Rp</i> , (S/C)	<i>Tm</i> (CD/RH/S) <i>Vm</i> (S/C)	<i>Cc</i> (AD2/S/C) <i>Nx</i> (AD1/AD2) <i>Rp</i> (S/C) <i>Tm</i> (CD/S/C) <i>Vm</i> (CD/AD1/S/C)	<i>Rp</i> (CD/S/C) <i>Tm</i> (CD/S) <i>Vm</i> (CD/S/C)	<i>Rp</i> (CD/S/C) <i>Vm</i> (CD/S/C)

En cuanto a los géneros con alta sensibilidad a ciertos antibióticos, se ha observado que todos salvo *Phyllobacterium* lo son a *Sm*. Este comportamiento se diferencia del mostrado frente a *Km*, otro aminoglicósido, lo que indica que en este ambiente la resistencia está más especializada



sobre *Km* que sobre *Sm*. Este efecto no se observó en los géneros analizados de la ría de Huelva en la que, para todos los géneros, el porcentaje de aislados *Sm<sup>r</sup>* fue siempre mayor que el de *Km<sup>r</sup>*. Entre los estudios que venimos comentado solo el de Pontes y cols. (2009) utilizó ambos antibióticos, observándose mayor abundancia de resistentes a uno u otro antibiótico según el género. Para los aislados del género *Bacillus* obtenidos de la Chorrera, la sensibilidad fue elevada solo al 50% de los antibióticos probados, lo que contrasta con los resultados de Walsh y Duffy (2013) quienes encontraron resistencias intrínsecas entre sus aislados del orden Bacillales para ocho de los diez antibióticos probados, y particularmente para los antibióticos *Cc*, *Rp*, y *Vm*, para los que los aislados resistentes de la Chorrera fueron poco abundantes. Los de la ría de Huelva fueron también mayoritariamente sensibles para prácticamente los mismos antibióticos con la diferencia entre los niveles de resistentes a *Sm* y *Km* indicada anteriormente puesta de manifiesto en este género.

Aunque las resistencias intrínsecas son de gran importancia en los ambientes clínicos, podrían ser más difícilmente transferidas a otras bacterias debido a su propia naturaleza. Por su importancia clínica, se han propuesto como posibles dianas para el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos en el futuro (Alvarez-Ortega *et al.* 2011), una vez se conozcan sus mecanismos de funcionamiento. En este sentido el estudio de las resistencias intrínsecas en bacterias ambientales puede ayudar a encontrar y conocer mejor esos posibles mecanismos, y la disponibilidad de bacterias ambientales que presentan este tipo de resistencias permitirá abordar este tipo de estudios.

Las resistencias adquiridas, que pueden serlo por mutación o por transferencia horizontal de genes, podrían, al menos en las portadas por elementos móviles, tener más posibilidades de diseminación, incluyendo la transferencia desde bacterias ambientales a bacterias del ámbito clínico si i) tienen la posibilidad de entrar en contacto y convivir juntas, ii) pueden alcanzar densidades celulares elevadas, iii) pueden transferirse entre grupos de bacterias filogenéticamente diversos y iv) la expresión de los genes necesarios es posible en las bacterias patógenas (Martínez y Baquero 2014).

Recientemente se ha propuesto un sistema para determinar el riesgo de interferencia en los tratamientos antiinfecciosos debido a los distintos tipos de genes de resistencia según estos parámetros (Martínez *et al.* 2015a), aunque ciertos criterios no han sido admitidos de forma general (Bengtsson-Palme y Larsson 2015, Martínez *et al.* 2015b). La determinación de cuales de las resistencias observadas son adquiridas permitirá utilizar estos aislados para abordar la detección de los elementos genéticos responsables, y en particular los móviles, como los plásmidos, y los que permiten la acumulación de multirresistencias, como los integrones, para determinar su naturaleza y sus posibilidades de difusión y transferencia a bacterias patógenas, lo que permitirá un mejor conocimiento de los riesgos que estas bacterias multirresistentes ambientales puedan tener para la salud humana y animal, bien directamente como agentes infecciosos o por sus posibilidades de transmisión de determinantes de resistencia, individuales o múltiples, a bacterias patógenas.

#### **5.3.2.4. Asociación de las resistencias a dos antibióticos según los géneros**

Considerando todas las bacterias aisladas de la Chorrera de Despeñalagua se detectó una concordancia muy buena, para la pareja *Nx/Tc*, además de cuatro buenas y tres moderadas, lo que supone un número de concordancias significativas muy elevado (tabla 25). Esto indicaría una cierta homogeneidad de estas resistencias asociadas entre los aislados y sugeriría la presencia de determinantes de resistencia asociados capaces de movilizarse de forma promiscua y conjunta entre la población. Un análisis detallado por géneros (tabla 25) nos muestra que este efecto observado a nivel global se debe a asociaciones de estas resistencias en los aislados de géneros concretos, por ejemplo, en el caso del género *Bacillus*, entre cuyos miembros seis parejas de antibióticos muestran concordancias muy buenas, correspondiendo con las mejores observadas cuando consideramos todos los aislados en su conjunto. De forma similar, se observan concordancias muy buenas entre los aislados del género *Serratia* para tres de las parejas con mejores concordancias en el género *Bacillus* y globalmente. Por otra parte, algunas de las concordancias muy buenas aparecen solo en un

género, es el caso de *Cc/Em* para *Aeromonas* y *Em/Vm* y *Rp/Vm* para *Bacillus*. Esto nos sugeriría la existencia en este sistema de elementos genéticos móviles, portadores de estas resistencias dobles, capaces de ser transferidos entre especies del mismo género pero sobre todo de otros transferibles entre géneros.

En el caso del género *Bacillus* las parejas de resistencias observadas podrían indicar la existencia de dos elementos genéticos que portasen resistencias a tres antibióticos cada uno, por un lado a *Km*, *Nx* y *Tc*, también presente en *Serratia*, y quizás en *Phyllobacterium*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*, y otro que portaría resistencias a *Em*, *Rp* y *Vm*. Los datos correspondientes a *Aeromonas* podrían sugerir una asociación de resistencias a *Cc*, *Em* y *Rp*, aunque los valores de concordancia menores indicarían que no estaría en la mayoría de los aislados de este género.

Estas asociaciones podrían deberse a un solo mecanismo común de resistencia para cada grupo de antibióticos, por ejemplo mediante bombas de eflujo, o a la presencia de genes de resistencia asociados en un solo elemento genético o en varios muy fácilmente transferibles y compatibles. Bombas de eflujo se han encontrado en miembros de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, algunas de las cuales son cromosomales pero otras se encuentran en plásmidos. En el caso de miembros del género *Bacillus*, que se ha estudiado menos activamente probablemente por su poca relevancia clínica, se han encontrado dos bombas de eflujo Bmr y Blt que presentan especificidad de sustratos similar (Ahmed *et al.* 1995), habiéndose descrito que la bomba Bmr hace a *B. subtilis* resistente a *Cc* y fluoroquinolonas, pero no a *Tc* o a *Nx* (Neyfakh *et al.* 1991, Neyfakh 1992, Kumar *et al.* 2013). En un estudio reciente (Fernández-Fuentes *et al.* 2014) se ha analizado la posible implicación de otras bombas detectadas en especies de *B. cereus*, *B. licheniformis* y otras especies de *Bacillus*, sin embargo ninguna de estas bombas parecen estar involucradas en la resistencia a los antibióticos probados en dicho estudio, incluyendo *Em*, uno de los encontrados en nuestro análisis formando parte de parejas de antibióticos con resistencias asociadas. Por el contrario detectaron la presencia de genes específicos de resistencia a macrólidos o a

aminoglicósidos. Estos datos no apoyarían la existencia de bombas de eflujo con la especificidad de antibióticos que justificaran las concordancias observadas en nuestro análisis, aunque no existen muchos datos y por tanto no podemos descartar que existan otras bombas con la especificidad requerida y que no hayan sido encontradas aún. En *P. aeruginosa* se han descrito sistemas de este tipo capaces de expulsar distintos antibióticos tales como *Nx*, *Cc*, *Em*, *Tc* y *Tm*, entre otros, (*mexAB*, *mexCD*, etc.) (Poole *et al.* 1993, De Kievit *et al.* 2001). La especificidad en cuanto a los antibióticos expulsados no parece totalmente compatible con nuestros resultados ya que algunos de los antibióticos que estas bombas expulsan no se encuentran entre los que se correlacionan en nuestro análisis estadístico de concordancia, como por ejemplo *Tm*, si bien la especie *P. aeruginosa* no es mayoritaria entre las encontradas en la Chorrera de Despeñalagua. En estudios futuros se intentará determinar si las correlaciones observadas tienen su origen en elementos genéticos móviles, en bombas de eflujo aún no descritas, o en sistemas de entrada compartidos.

#### **5.4. Prevalencia de los aislados resistentes a ertapenem y determinación de sus CMI**

##### **5.4.1. Ría de Huelva**

Se conocen diversos mecanismos por los que las bacterias pueden ser resistentes a betalactámicos, incluyendo el uso de bombas de eflujo, alteración del blanco de la acción de los antibióticos o la presencia de enzimas inactivantes denominadas betalactamasas. Entre éstas se encuentran las carbapenemasas capaces de inactivar los antibióticos betalactámicos denominados carbapenemas, entre los cuales se encuentra el ertapenem. Estas enzimas están siendo encontradas cada vez con más frecuencia en bacterias clínicas y ambientales, suponiendo un grave peligro para los tratamientos de enfermedades infecciosas graves en las que este tipo de antibióticos son de último recurso (Cai *et al.* 2008, Mathers *et al.* 2011, Castanheira *et al.* 2014, Woodford *et al.* 2014). Por esta razón se decidió investigar la prevalencia de la resistencia a ertapenem entre los aislados obtenidos de los dos ecosistemas estudiados en este trabajo. Otro mecanismo de resistencia a estos antibióticos que cada vez están siendo más

considerado es la alteración, en distintas formas, de las proteínas de membrana que permiten el paso del antibiótico a través de la membrana externa en las bacterias gramnegativas (Rice 2007). Entre estas porinas se encuentran una serie de proteínas de las familias OmpC y OmpF (Nestorovich *et al.* 2002, Wolter *et al.* 2004, Pagès *et al.* 2008). La falta, mutación, o bloqueo de algunas de estas proteínas podría suponer un impedimento de la entrada del antibiótico disminuyendo así su efecto (Doumith *et al.* 2009, Fernández y Hancock 2012, Lavigne *et al.* 2013).

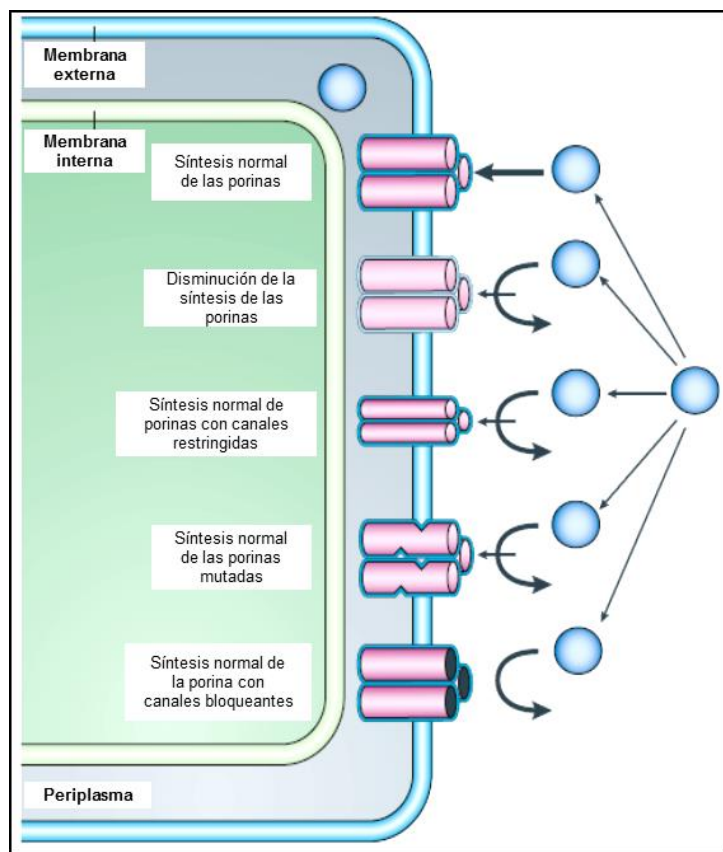
En nuestro estudio se ha observado un elevado número de aislados de la ría de Huelva resistentes a *Ep* (79,7%) (tabla 27). En un estudio utilizando muestras en distintos enclaves a lo largo del río Lagan, en el norte de Irlanda, (Moore *et al.* 2010), el 64,3% de las muestras contenían bacterias resistentes a este antibiótico, si bien no se determinaron que bacterias concretas ni el porcentaje de resistentes frente al total de bacterias presentes o cultivables.

Al analizar los porcentajes de aislados resistentes a las distintas concentraciones de antibiótico que hemos probado (tabla 26), se observa que a cualquier concentración los porcentajes son elevados, más del 50%, en las dos zonas de muestreo, sin diferencias importantes entre las fases líquidas de ambas zonas, pero si en los sedimentos, con valores siempre mayores en el de la zona H2 con respecto al de la H1. Estas diferencias fueron notablemente mayores a concentraciones de 2-8 µg/mL de antibiótico, mostrando una mayor selectividad de estas concentraciones para determinar las bacterias resistentes. Para la zona H1 hubo mayores porcentajes de resistentes en la fase líquida que en el sedimento, particularmente a las concentraciones más altas, pero ocurrió al contrario con la zona H2. Estos resultados apoyarían una mayor homogeneización de las bacterias resistentes presentes en las fases líquidas debido a su mayor movilidad y posibilidad de intercambio entre las dos zonas, que en el caso de los sedimentos, en una dirección similar a la observada para los demás antibióticos estudiados previamente.

Cuando diferenciamos entre aislados procedentes de medio marino o nutritivo (figura 20), observamos un mayor efecto del antibiótico sobre los

procedentes de medio nutritivo, con porcentajes de aislados que se diferencian incluso a concentraciones de antibiótico más bajas (figura 20). Podríamos considerar dos posibles efectos, un aumento de la resistencia de las bacterias debido a la acción del medio sobre el antibiótico, que pudiera afectar su estructura o su transporte, o un efecto de la adaptación de las bacterias, mediante cambios en su expresión génica, que indujese la actuación de mecanismos de resistencia en el medio salado, como por ejemplo de bombas de membrana o la expresión de las porinas involucradas. Distintos estudios sobre bacterias en ambientes clínicos han descrito que durante la antibioterapia empleando betalactámicos se puede producir cambios en la expresión o inactivación de las porinas que determinan la capacidad de entrada de ciertas betalactamas en poco tiempo (Szabó *et al.* 2006, Philippe *et al.* 2015), en particular de las voluminosas o cargadas negativamente (como es el caso del ertapenem) (Pagès *et al.* 2008). En algunos casos esta adaptación supone la expresión diferencial de la porina OmpF, con menor capacidad de transportar estos antibióticos, en detrimento de la porina OmpC, con mayor capacidad (Medeiros *et al.* 1987, Pàges *et al.* 2008). En otros casos se ha observado la inactivación insercional del gen de la porina como causa de la aparición de la resistencia a carbapenemas (Hernández-Allés *et al.* 1999, Wolter *et al.* 2004). De forma sinérgica en el efecto podrían también actuar bombas de eflujo (Szabó *et al.* 2006, Fernández y Hancock 2012, Li *et al.* 2015). Uno de los factores que se ha visto que afecta a la expresión de estas porinas es la osmolaridad del medio, de tal forma que algunas bacterias pueden ver afectado el nivel de éstas a distintas concentraciones salinas, observándose fenotipos resistentes determinados por la baja expresión de OmpC en estas bacterias (Medeiros *et al.* 1987). Según estos datos y aunque la concentración salina más elevada empleada fue baja (0,5% NaCl) en comparación con la del medio marino, el efecto del incremento de la osmolaridad, sobre la expresión de las porinas sería el responsable de los cambios sobre la resistencia. Estos efectos serán dependientes del tipo de bacteria (los estudios realizados descritos anteriormente se refieren a bacterias de origen clínico) y sus capacidades para modificar su expresión según factores ambientales. Otros mecanismos dependientes de la entrada del antibiótico (figura 32) también podrían darse.

Finalmente habría que considerar que muchas bacterias se muestran resistentes a carbapenemas debido a la presencia de carbapenemasas, las cuales está siendo descritas cada vez con mayor frecuencia en distintas bacterias de ambientes clínicos y ambientales (Nordmann 2014, Castanheira et al. 2014, Zamorano et al. 2015).



**Figura 32.** Mecanismos de resistencia a carbapenemas dependientes de la entrada del antibiótico. Modificado de Pàges et al. 2008.

Para el estudio de las bacterias resistentes a *Ep* se ha considerado un valor de concentración del antibiótico  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ . En estas condiciones, se han encontrado porcentajes de bacterias resistentes superiores entre los aislados sobre medio marino, tanto a nivel global de la ría como en ambas zonas de muestreo y en ambas fases (tabla 27). Teniendo en cuenta el mismo criterio utilizado anteriormente en este estudio, se han detectado resistencias intrínsecas a *Ep* en los aislados pertenecientes a los géneros *Erythrobacter*, *Mesonina*, *Methylobacterium* y *Sphingopyxis* (figura 21), cuando consideramos conjuntamente todos los aislados de la ría. Aunque se conoce poco sobre la resistencia a este antibiótico en bacterias medioambientales discutiremos a

continuación algunos de los trabajos en los que se han descrito algunas bacterias resistentes a carbapenemas en algunos medios acuáticos.

En un estudio reciente sobre (Girlich *et al.* 2012), genes de carbapenemasas presentes en varias especies de colección del género *Erythrobacter* fueron expresadas en *E. coli*, determinándose que las procedentes de las distintas especies presentaban valores de CMI diferentes pero que solo algunas aumentaban su valor con respecto a un control. Igualmente se observó que las secuencias de los genes de los enzimas diferían mucho entre sí (45%-75% identidad), lo que indica que aunque la resistencia pudiera ser común, y por tanto se podría considerar como intrínseca en este género, sin embargo los determinantes de dicha resistencia eran diferentes según la especie. Zheng y cols. describieron en 2011 la similitud entre la betalactamasa NDM-1, con alta actividad carbapenemásica, con la betalactamasa II de *Erythrobacter litoralis*, demostrando que ésta tiene actividad contra imipenem y meropenem.

Furuhata y cols. (2006) describieron la presencia de especies de *Methylobacterium* resistentes a imipenem (CMI<sub>90</sub>=1µg/mL) en agua de grifo en un hospital de Japón. Bacterias de este género han sido poco estudiadas en cuanto a su resistencia a antibióticos y particularmente a carbapenemas, pero han sido encontradas en aguas de bebida y en el microbioma humano, sugiriéndose que podrían ser fuente directa o indirecta de bacterias resistentes a antibióticos en este microbioma (Vaz-Moreira *et al.* 2014).

Walther-Rasmussen y cols. (2007), en una revisión sobre carbapenemasas de la clase A utilizaron una secuencia de este tipo de enzimas encontrada en el genoma secuenciado de *Sphingopyxis alaskensis*, y Lamoureaux y cols. (2013) describieron una bacteria ambiental del género *Sphingobium* (filogenéticamente relacionado con *Sphingopyxis*) con una nueva betalactamasa de espectro extendido que confería un aumento de ocho veces en la CMI de *Ep*, aunque no a la de otras carbapenemas. Secuencias similares se encontraron en los genomas secuenciados de varios miembros de este género, por lo que se ha considerado como una resistencia intrínseca. En un estudio de la presencia de bacterias de la familia *Sphingomonadaceae* en una planta de tratamiento de aguas de bebida, agua



de grifo etc., se observó la presencia de miembros de los géneros *Sphingobium* y *Sphingomonas* resistentes a imipenem y sobre todo a meropenem, sin embargo los aislados del género *Sphingopyxis* solo fueron resistentes en unas pocas especies concretas. En ningún caso se observó una resistencia intrínseca a estos antibióticos (Vaz-Moreira *et al.* 2011). También en un reciente estudio de la presencia de bacterias de la familia *Sphingomonadaceae* en agua de grifo de hospitales se encontraron bacterias de la especie *Sphingobium yanoikuyae* resistentes a meropenem (Narciso da Rocha *et al.* 2014).

En unos de los pocos intentos por determinar la prevalencia de bacterias resistentes a carbapenemas en el medio ambiente, Henriques y cols. (2012) y Tacão y cols. (2015) determinaron la abundancia y diversidad de bacterias resistentes a carbapenemas en agua no tratada y de río, concluyendo la existencia de una baja abundancia de estas bacterias, pero identificando bacterias intrínsecamente resistentes a imipenem, incluyendo miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas* etc., pero no especies de los géneros que nosotros hemos encontrado en la ría de Huelva como intrínsecamente resistentes a ertapenem. Estas diferencias pueden deberse a la propia naturaleza de los medios acuáticos estudiados o a que la selección se hizo con otra carbapenema, que puede verse afectada de forma distinta por los determinantes de resistencia (Pàges *et al.* 2008, Lamoureaux *et al.* 2013, Dreier y Ruggerone 2015).

Considerando por separado según muestra y según medio de aislamiento (figura 22), se observa que entre los de las dos zonas de muestreo aparece como intrínsecamente resistente el género *Erythrobacter* mientras que en los de la zona H2 aparecen también como tales los de los géneros *Mesonía* y *Methylobacterium*. Cuando analizamos los porcentajes de resistentes por género según los medios de aislamiento se observa una resistencia intrínseca de los aislados sobre medio nutritivo del género *Methylobacterium* y de seis géneros de los obtenidos sobre marino. Estos datos mostrarían una gran prevalencia entre los aislados en medio marino de géneros con resistencia intrínseca al antibiótico. Cuando analizamos con más detenimiento la procedencia de los aislados que aparecen como resistentes

intrínsecos (tabla 13), se pone de manifiesto que los del género *Methylobacterium* solo fueron aislados sobre medio nutritivo. Una situación similar se observa para los aislados del género *Mesonía*, en este caso aislados solo sobre medio marino. De los demás géneros que aparecen como intrínsecamente resistentes, considerando los aislados sobre medio marino, también se obtuvieron aislados sobre nutritivo, pero el número de ellos fue muy bajo para ser considerados en este análisis. Otros géneros que solo fueron aislados en medio marino (tabla 13) fueron *Ponticaulis* y *Pseudoalteromonas*, los cuales no aparecen como intrínsecamente resistentes (figura 22). La existencia de aislados de estos géneros que no se mostraron resistentes a *Ep* en medio marino indicaría que la actividad del antibiótico no es eliminada durante el cultivo en presencia del medio marino, y que posiblemente la resistencia intrínseca observada en los aislados en este medio es real, independientemente de que pueda deberse a mecanismos de adaptación al medio que supongan la expresión diferencial de porinas y/o de bombas de eflujo en los distintos miembros de cada género, o a la presencia de factores estructurales o de determinantes cromosomales responsables, específicos de estos géneros. En alguno de éstos aislados los mecanismos de resistencia podrían o no existir o funcionar mejor en unos que en otros.

La CMI de *Ep* varía según la clase de microorganismo del que se trate y a pesar del amplio espectro de acción del antibiótico y las bajas concentraciones a las que puede actuar generalmente, se han descrito cepas bacterianas para las que las CMI<sub>90</sub> son > 8,0 µg/mL, mostrando que el antibiótico puede tener una actividad limitada sobre los bacilos gramnegativos no fermentadores como *Pseudomonas* y también frente a enterococos (Gobernado y Acuña 2007). En nuestro estudio, casi el 70% de las bacterias analizadas presentaron una CMI a *Ep* superior a 8,0 µg/mL (figura 23). Se observaron porcentajes igualmente elevados cuando consideramos solo los aislados sobre marino, tanto para los de las fases líquidas como para los procedentes de los sedimentos de las dos zonas de muestreo (figura 24A), aunque el porcentaje fue mayor para los de sedimento, siendo muy similares en los grupos de aislados equivalentes en las dos zonas

de muestreo. El porcentaje de aislados en medio nutritivo con CMI  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$  fue muy inferior al obtenido en medio marino, aunque con la excepción de los procedentes del sedimento de la zona H2, que fue similar. De nuevo aquí encontramos una notable diferencia entre los aislados en medios marino y nutritivo. En el caso de los procedentes de medio nutritivo, con excepción del caso de H2S-N, la distribución de aislados con distintos valores de CMI es más parecida entre ellos, mostrando una mayor diversidad de niveles de resistencia (figura 24B). Posiblemente el alto nivel de aislados con elevado CMI en la muestra H2S, entre los de medio nutritivo, se deba a una menor biodiversidad de éstos (tabla 15) y a que todos los del género *Methylobacterium* proceden del medio nutritivo y de esa muestra y son intrínsecamente resistentes a este antibiótico (figura 22). Las concentraciones a las que el antibiótico ejerce su efecto parece ser mayores cuando el análisis se hace en medio marino, con los aislados obtenidos sobre dicho medio. Sin embargo, este efecto, al igual que hemos analizado anteriormente con respecto al carácter intrínseco de las resistencias, tiene relación con la diversidad y origen filogenético de las bacterias obtenidas sobre este medio. Algunos aislados pertenecientes a ciertos géneros que solo se ha encontrado sobre medio marino (tabla 13), mostraron CMI  $\leq 8,0$   $\mu\text{g/mL}$  (tabla 28), por ejemplo en dos de los diez del género *Mesonina* (CMI 2,0-4,0  $\mu\text{g/mL}$ ), en ocho de los catorce del género *Ponticaulis* (CMI  $\leq 0,063$ -8,0  $\mu\text{g/mL}$ ), o en siete de las diecisiete *Pseudoalteromonas* (CMI 0,125-8,0  $\mu\text{g/mL}$ ), entre otros. Esto nos lleva a pensar que el alto porcentaje de aislados con CMI  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$  entre los de medio marino, no es una consecuencia de un efecto inactivante del medio sobre el antibiótico, ya que este se muestra activo dependiendo del género y, dentro de este nivel filogenético, dependiendo del aislado. Por otro lado aislados sobre medio marino o sobre medio nutritivo del mismo género también muestran una distribución de valores diferentes de CMI entre sus miembros. Por ejemplo miembros del género *Altererythrobacter*, de los que veintitrés procedían de medio marino y seis de medio nutritivo, la mayoría de los de medio marino muestran CMI  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$ , pero para uno es 4,0  $\mu\text{g/mL}$ , y entre los de medio nutritivo ninguno tiene CMI  $>8,0$   $\mu\text{g/mL}$ , con valores diferentes para cada aislado con un máximo de 2,0  $\mu\text{g/mL}$ . Otro ejemplo relevante es el de los aislados del género

*Microbacterium* de los que seis proceden de medio nutritivo, y entre los cuales tres tiene CMI >8,0 µg/mL mientras que las de los otros tres varían de 0,5 a 2,0 µg/mL, y con doce aislados de medio marino de los cuales nueve tienen CMI >8,0 µg/mL, pero los demás presentan CMIs de 2,0 a 8,0 µg/mL. Todos estos ejemplos muestran que los niveles de CMI observada dependen del género más que del medio, con una tendencia a que los de medio marino de cada género sean menos sensibles al antibiótico. No obstante, una cierta influencia del medio sobre la actividad del antibiótico tampoco podemos descartarla totalmente. La disponibilidad de varios aislados del mismo género con distintas susceptibilidades al antibiótico podrá permitir en el futuro un análisis más profundo de como la actividad del antibiótico pueda o no verse afectada por la composición del medio.

#### **5.4.2. Chorrera de Despeñalagua**

La prevalencia de aislados de este sistema resistentes a *Ep* fue inferior a la observada entre los de la ría de Huelva, tanto en cuanto a los resistentes a la máxima concentración probada (8,0 µg/mL), 19,20% frente a 69,8%, como para la más baja (0,063 µg/mL), 87,90% frente a 98,4%, destacando la diferencia muy notable entre los resistentes a la más alta (figuras 19 y 25). Esto podría estar relacionado con las características de los dos ecosistemas que dan lugar a una notable diferencia entre los tipos de bacterias en uno u otro, o también estar relacionado con el mayor porcentaje de aislados obtenidos sobre medio marino a partir de las muestras de la ría de Huelva.

A todas las concentraciones de antibiótico el porcentaje de resistentes fue mayor entre los aislados de la zona G2 que entre los de la G1, aunque las diferencias fueron pequeñas (figura 26), pero fueron sin embargo notables entre los aislados sobre medio marino con respecto a los de medio nutritivo (figura 27). Teniendo en cuenta que la representación entre los aislados de G2 de los obtenidos sobre medio marino es del 54,3%, y solo del 25% entre los de G1, no se aprecia una correlación entre la pequeña diferencia observada entre G2 y G1 y la proporción que representan los aislados sobre medio marino en ambas muestras, indicando que ésta no es la responsable del mayor porcentaje de resistentes observada entre los de medio marino, y

ya que, además, en el conjunto de la Chorrera, el porcentaje de aislados en medio nutritivo es superior al de los de medio marino.

Los porcentajes de aislados resistentes a al menos 2,0 µg/mL fue 89,1% entre los de medio marino pero solo del 9,5% entre los de nutritivo (tabla 29). Estos porcentajes en la ría de Huelva fueron 89,3% y 40,6% respectivamente (tabla 27). Como se puede ver, los porcentajes son muy parecidos en cuanto a los aislados de medio marino en los dos sistemas, pero la diferencia es notable entre los de nutritivo con un porcentaje unas cuatro veces mayor en los aislados de la ría. Esto podría indicar que las poblaciones de aislados de este ecosistema, incluso creciendo sobre medio nutritivo, están adaptadas por su origen en un ambiente salino y expresan determinantes que confieren resistencia a este antibiótico a un mayor porcentaje de aislados. Los valores similares de los porcentajes sobre medio marino en ambos ecosistemas podría indicar que o los aislados de la Chorrera ya eran resistentes en su hábitat o que esta resistencia se ha desarrollado rápidamente durante el tiempo de aislamiento de estas bacterias sobre el medio marino. Un efecto rápido de aumento de la resistencia por adaptación a medios salinos se ha visto que puede ocurrir con otros antibióticos (Navavaty *et al.* 1998, Lee *et al.* 2012, Yoon *et al.* 2013), y también puede ocurrir, afectando a la expresión de porinas involucradas en la entrada de las carbapenemas, a los pocos días de iniciado el tratamiento con éstas (Medeiros *et al.* 1987, Pagès *et al.* 2008).

Considerando todos los aislados de la Chorrera de Despeñalagua por géneros, podemos ver que ninguno de los géneros analizados se muestra intrínsecamente resistentes a *Ep* (figura 28).

Entre los aislados de *Pseudomonas* solo un 3,8% se asignó a *P. aeruginosa*, la especie de este género más común en ambientes clínicos, y ninguna fue resistente, lo que resulta un poco sorprendente ya que se han descrito cepas de esta especie que presentan CMI de *Ep* >32 µg/mL y por tanto resistentes (Gobernado *et al.* 2007b) y en estudios sobre el espectro de acción de este antibiótico, se ha considerado como poco eficaz contra bacilos gramnegativos no fermentadores como *P. aeruginosa* (Zhanel *et al.* 2005). Si fue resistente un porcentaje cercano al 40% de los aislados de este género,

lo que indica que otras de las especies ambientales encontradas son resistentes al antibiótico, aunque no podríamos considerar que la resistencia fuera intrínseca del género. Si consideramos los aislados de este género según la zona de procedencia y el medio de aislamiento nos encontramos que la mayoría de aislados resistentes proceden de la zona G2 (figura 29), con un elevado porcentaje de resistentes entre los obtenidos sobre medio marino.

Los otros dos géneros con mayor número de aislados tampoco se muestran intrínsecamente resistentes, considerados en conjunto, o según la zona de muestreo, o si consideramos los aislados sobre medio nutritivo, sin embargo sí que muestran un porcentaje de resistentes  $\geq 90\%$  si consideramos los obtenidos en medio marino. También en estos géneros parece haber un efecto del medio sobre las características de resistencia mostradas por los aislados obtenidos sobre él.

Los aislados de la Chorrera presentan valores de CMI que se distribuyen de forma casi regular (figura 30). Sin embargo, cuando analizamos las distribuciones en función de las muestras y medios (figura 31), observamos que son muy parecidas para los aislados de una u otra zona de muestreo sobre medio marino, con porcentajes elevados de éstos con valores máximos de CMI, mientras que en los de medio nutritivo la distribución se centra en valores más bajos.

Valores máximos de CMI se observaron (tabla 30) para un tercio de los aislados del género *Bacillus*, mientras que los del género *Pseudomonas* tuvieron una distribución alrededor de valores más bajos, mostrándose en general más sensibles al antibiótico. Un cuarto de los aislados de *Rahnella* tuvieron un valor muy bajo de CMI ( $\leq 0,063 \mu\text{g/mL}$ ) con el resto distribuido por igual en un rango de valores. En los del género *Serratia* se observó una distribución de aislados a lo largo de toda la escala con máximos en los dos extremos de ésta. La distribución de valores de CMI no siguió ningún patrón común en los distintos géneros. Cuando analizamos los valores de CMI de los aislados de estos géneros según hubiesen sido aislados sobre medio nutritivo o marino, se aprecia que los procedentes de medio marino tienen mayoritariamente valores más elevados de CMI que los del mismo género

procedentes de nutritivo. Particularmente diferentes fueron las CMI's más frecuentes entre los aislados del género *Serratia*, que mostraron valores mínimos entre los aislados de medio nutritivo y elevados en los de medio marino. Se han descrito cepas de *Serratia* con altos o bajos valores de resistencia a *Ep*, relacionado con la producción de betalactamasas o carbapenemasas (Osano *et al.* 1994, Livermore *et al.* 2001) o con mecanismos no bien conocidos mediados por las proteínas CarF y CarG en una especie de *Serratia* productora de una carbapenema (Coulthurst *et al.* 2005, Tichy *et al.* 2014). En estudios futuros podremos determinar si este es el caso de las de altas o bajas CMI's observadas según el medio, o si se trata de fenómenos de adaptación que cambian las propiedades de entrada (porinas)-expulsión (bombas de eflujo) de estas bacterias según las características del medio de cultivo o incluso de una combinación de ambos como se ha visto con frecuencia en algunas bacterias de interés clínico (Tängdén *et al.* 2013).

## **6. CONCLUSIONES**





## 6. CONCLUSIONES

1. Se ha determinado la abundancia de bacterias resistentes a once antibióticos en dos sistemas acuáticos, la ría de Huelva y la Chorrera de Despeñalagua (Guadalajara), para dos puntos de muestreo en cada uno, y en el caso de la de la ría analizando aguas y sedimentos por separado. La abundancia se ha determinado sobre medios sólidos nutritivo y marino, observando abundancias, relativas a las bacterias cultivables, en general mayores sobre medio marino para las muestras de la ría, tanto de aguas como de sedimento, y en nutritivo para las de la Chorrera.
2. Las abundancias relativas más elevadas en la ría fueron, en general, para bacterias resistentes a *Tc*, *Tm* y *Vm* entre las cultivadas en medio marino, y a *Tm* y *Vm* entre las determinadas sobre nutritivo, mientras que las menos abundantes fueron las correspondientes a *Cc*, *Em* y *Rp* entre las de medio marino y a *Cc*, *Km*, *Rp* y *Tc* entre las de nutritivo. En el caso de la Chorrera las más abundantes sobre medio marino fueron también a *Tc*, *Tm* y *Vm*, aunque en el punto de muestreo G2 también lo fueron a *Ap* y *Nx*, y sobre nutritivo a *Ap*, *Em*, *Tm*, y *Vm*. Las menos abundantes fueron sobre medio marino a *Cc* y a *Sm*, y sobre nutritivo a *Nx* y *Tc*.
3. Se han aislado bacterias resistentes a ampicilina de ambos ecosistemas, 579 a partir de la ría y 505 a partir de la Chorrera y se ha determinado su resistencia a otros diez antibióticos, observándose una mayor diversidad en la multirresistencia de los aislados de la ría, con un total de 143 perfiles, que en la de los de la Chorrera con 92.
4. Se ha calculado el índice MAR como indicativo del nivel de multirresistencia de los aislados, individualmente y agrupados en función de las zonas de muestreo, de las fases de éstas de donde proceden y de los medios de cultivo en los que fueron obtenidos, observándose distribuciones de estos valores con medianas que indican la resistencia a más de la mitad de los antibióticos probados en la mayoría de los casos, y determinando mayor nivel de

multirresistencia entre los aislados sobre medio nutritivo de la ría y entre los de marino de la Chorrera.

5. Los aislados con diferentes perfiles de multirresistencia y fenotipos de colonia se han identificado a nivel de especie, encontrándose que los de la ría se distribuyen en 8 clases, predominando las alfarproteobacterias, un total de 51 géneros, con predominio de *Erythrobacter* y más de 80 especies, mientras que los de la Chorrera se distribuyen entre 6 clases, predominando las gammaproteobacterias, un total de 20 géneros, mayoritariamente *Pseudomonas*, y cerca de 40 especies. Cepas de algunas de las especies encontradas se han descrito como patógenos de humanos, peces o plantas.
6. Se ha determinado que algunos de los géneros representados con mayor número de aislados muestran resistencias a ciertos antibióticos, que podríamos considerar como intrínsecas. Las demás resistencias, observadas solo en algunos de los aislados, podrían ser adquiridas, identificándose así como candidatas a ser transmisibles si sus determinantes genéticos fuesen portados por elementos genéticos móviles, lo que podrá ser determinado en el futuro analizando molecular y fisiológicamente los aislados que se han caracterizado en este estudio.
7. La determinación de las resistencias que serían adquiridas, según el criterio utilizado, ha permitido analizar estadísticamente la posible asociación de las resistencias a dos antibióticos en el mismo aislado de entre los del mismo género, y encontrar algunas estadísticamente probables. En particular en los aislados de la ría se han encontrado asociaciones de la resistencia a *Nx* y *Tc* en los del género *Bacillus*, a *Cc* y *Tc* en los de *Mesonía*, a *Cc* y *Em* y a *Tm* y *Vm* en los de *Pseudomonas*, y a otras seis parejas de antibióticos en los del género *Paenibacillus*. Estas parejas de resistencias podrían compartir mecanismos como la expulsión de los antibióticos de la célula por la misma bomba de eflujo o estar codificados conjuntamente en elementos genéticos transmisibles entre las bacterias de cada género.

8. El análisis estadístico de la asociación de resistencias a dos antibióticos ha señalado, en el caso de los aislados de la Chorrera, correlaciones de resistencias que aparecen en común en varios géneros, tales como a las parejas Nx/Tc, Km/Tc y Km/Nx compartidas por los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, lo que nos indicaría la posible existencia de elementos genéticos móviles que portarían estos determinantes de resistencia y que serían promiscuos entre estos géneros. La presencia de tales elementos y su posible transferibilidad podrá ser estudiada en el futuro al disponer de las bacterias que los comparten.
9. Se determinó la CMI de ertapenem y la prevalencia de la resistencia a este antibiótico de los aislados obtenidos de los dos ecosistemas, detectándose altos valores de ambas, con porcentajes de resistentes, en el conjunto de los aislados de uno u otro sistema, de aproximadamente el doble en los de la ría que en los de la Chorrera, y detectándose resistencias intrínsecas a este antibiótico entre los aislados de la ría para el género *Methylobacterium*, obtenido sobre medio nutritivo, y para otros 6 de los aislados en marino, mientras que entre los de la Chorrera solo se detectaron tal tipo de resistencias en los aislados sobre marino de los géneros *Bacillus* y *Serratia*.
10. Durante el desarrollo de este proyecto, se ha observado un efecto del medio marino sobre la susceptibilidad de las bacterias aisladas en él a los antibióticos Tc y Ep, detectándose una mayor resistencia entre las obtenidas y probadas sobre este medio lo que, en base a lo observado en este estudio y a lo descrito en la bibliografía, podría sugerir la existencia en estos aislados de mecanismos de adaptación a condiciones de osmolaridad elevada, que pudieran afectar a la entrada de los antibióticos en la célula o a la expulsión de éstos, una vez dentro. Estos aislados podrían utilizarse en el futuro para esclarecer estos mecanismos y su posible relevancia en bacterias ambientales, en las que estos fenómenos son prácticamente desconocidos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed M, Lyass L, Markham PN, Taylor SS, Vázquez-Laslop N, Neyfakh AA (1995). Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. J Bacteriol 1995 177(14):3904-3910.
- Alekshun MN, Levy SB (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 128:1037-1050.
- Al-Nabulsi AA, Osaili TM, Shaker RR, Olaimat AN, Jaradat ZW, Elabedeen NAZ, Holley RA (2015). Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol 46:154-160.
- Alonso A, Sánchez P, Martínez JL (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environ Microbiol 3(1):1-9.
- Altman DG (1991). Practical statistics for medical research. Chapman and Hall. Nueva York.
- Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock RE, Martínez JL (2011). The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to  $\beta$ -lactams. Virulence 2(2):144-146.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol 8:251-259.
- Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J (2009). Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. ISME J 3(2):243-251.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59:143-169.
- Aminov RI (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Environ Microbiol 11:2970–2988.

- Aminov RI (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* 2:158, doi: 10.3389/fmicb.2011.00158.
- Amos GCA, Zhang L, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM (2014). Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Vet Microbiol* 171 (3-4):441-447.
- Andersson DI, Hughes D (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12:465-478.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14(4):176-182.
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 19:260-265.
- Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427:72-74.
- Beiras-Fernandez A, Vogt F, Sodian R, Weis F (2010). Daptomycin: a novel lipopeptide antibiotic against Gram-positive pathogens. *Infect Drug Resist* 3:95-101.
- Bello CS (2007). *Pseudomonas stutzeri*: a rare cause of neonatal septicemia. *East Mediterr Health J* 13(3):731-734.
- Bengtsson-Palme J, Larsson DG. (2015). Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nat Rev Microbiol* 13(6):396. doi: 10.1038/nrmicro3399-c1.
- Benton B, Breukink E, Visscher I, Debabov D, Lunde C, Janc J, Mammen M, Humphrey P (2007). Telavancin inhibits peptidoglycan biosynthesis through preferential targeting of transglycosylation: Evidence for a multivalent interaction between telavancin and lipid II. *Int. J Antimicrob Agents (Suppl.)* 29:51-52.

- Bernard L, Schäfer H, Joux F, Courties C, Muyzer G, Lebaron P (2000). Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquatic Microbiol Ecol* 23:1-11.
- Bezverbnaya TP, Buzoleva LS, Khristoforova S (2005). Metal-resistant heterotrophic bacteria in coastal waters of Primorye. *Russ J Mar Biol* 31:73-77.
- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD (2012). Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE* 7(4):e34953. doi:10.1371/0034953.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV (2015). Molecular mechanism of antibiotic resistance. *Nature* 13:42-51.
- Blasco MD, Esteve C, Alcaide E (2008). Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *J Appl Microbiol* 105:469-475.
- Bockstael K, Van Aerschot A (2009). Antimicrobial resistance in bacteria. *Cent Eur J Med* 4(2):141-155.
- Brown MG, Balkwill DL (2009). Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb Ecol* 57:484-493.
- Buss SN, Starlin R, Iwen PC (2014). Bacteremia caused by *Microbacterium binotii* in a patient with sickle cell anemia. *J Clin Microbiol* 52(1):379-381.
- Button DK, Schut F, Quang P, Martin R, Robertson BR (1993). Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol.* 59(3):881-891.
- Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX (2008). Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 52(6):2014-2008.

- Calabrese EJ (2013). Hormetic mechanisms. Crit Rev Toxicol. 43(7):580-606.
- Calvo J, Martínez-Martínez L (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin 27(1):44-52.
- Campos-Herrero MI, Bordes A, Rodríguez H, Perera A, González B, Conde A (1997). *Pseudomonas stutzeri* community-acquired pneumonia associated with empyema: case report and review. Clin Infect Dis 25(2):325-326.
- Cantón R (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. Clin Microbiol Infect 15 (Suppl. 1):20-25.
- Cantón R, Morosini MI (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiol Rev 35:977-991.
- Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN (2014). Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother 69(7):1804-1814.
- Corbin A, Delatte C, Besson S, Guidry A, Hoffmann AH 3<sup>rd</sup>, Monier P, Nathaniel R (2007). *Budvicia aquatica* sepsis in an immunocompromised patient following exposure to the aftermath of Hurricane Katrina. J Med Microbiol 56(Pt 8):1124-1125.
- Coulthurst SJ, Barnard AM, Salmond GP (2005). Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. Nat Rev Microbiol 3(4):295-306.
- Cox G, Wright GD (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. Int J Med Microbiol 303:287-292.



- Crémet L, Bemer P, Zambon O, Reynaud A, Caroff N, Corvec S (2009). *Chitinophaga terrae* bacteremia in human. *Emerg Infect Dis* 15(7):1134-1135.
- Chai LJ, Jiang XW, Zhang F, Zheng BW, Shu FC, Wang ZL, Cui QF, Dong HP, Zhang ZZ, Hou DJ, She YH (2015). Isolation and characterization of a crude oil degrading bacteria from formation water: comparative genomic analysis of environmental *Ochrobactrum intermedium* isolate versus clinical strains. *J Zhejiang Univ Sci B* 16(10):865-874.
- Chen Z, Zhang Y, Gao Y, Boyd SA, Zhu D, Li H (2015a). Influence of dissolved organic matter on tetracycline bioavailability to an antibiotic-resistant bacterium. *Environ Sci Technol* 49(18):10903-10, doi: 10.1021/acs.est.5b02158.
- Chen Z, Li H, Feng J, Li Y, Chen X, Guo X, Chen W, Wang L, Lin L, Yang H, Yang W, Wang J, Zhou D, Liu C, Yin Z (2015b). NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes*. *Front Microbiol* 6:294, doi: 10.3389/fmicb.2015.00294.
- Cheuk W, Woo PC, Yuen KY, Yu PH, Chan JK (2000). Intestinal inflammatory pseudotumour with regional lymph node involvement: identification of a new bacterium as the aetiological agent. *J Pathol* 192(3):289-292.
- Chung IY, Kim YK, Cho YH (2014). Common virulence factors for *Pseudomonas tolaasii* pathogenesis in *Agaricus* and *Arabidopsis*. *Res Microbiol* 165(2):102-109.
- D'Costa VM, Griffiths E, Wright GD (2007). Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr Opin Microbiol* 10:481-489.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN,

- Wright GD (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457-461.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311:374–377.
  - Da Re S, Ploy MC (2012). Antibiotiques et réponse SOS bactérienne. Une voie efficace d'acquisition des résistances aux antibiotiques. *Med Sci (Paris)* 28(2):179-184.
  - Davies J (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-382.
  - Davies J (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33:496-499.
  - Davies J (2011). How to discover new antibiotics: harvesting the parvoma. *Curr Opin Chem Biol* 15:5-10.
  - Davies J, Davies D (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74 (3): 417-433.
  - De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG (2001). Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6):1761-1770.
  - Dib JR, Weiss A, Neumann A, Ordoñez O, Estévez MC, Farías ME, Ordonez O, Estevez MC, Farias ME (2009). Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lakes able to grow in the presence of antibiotics. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 4(1):66-76.
  - Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 63(4):659-667.
  - Dover LG, Alderwick LJ, Brown AK, Futterer K, Besra GS (2007). Regulation of cell wall synthesis and growth. *Curr Mol Med* 7:247-276.

- Dreier J, Ruggerone P (2015). Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol 6:660, doi: 10.3389/fmicb.2015.00660.
- Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X (2008). Quinolone-mediated bacterial death. Antimicrob Agents Chem 52:385-392.
- Drlica K, Zhao X (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev 61:377-392.
- Drudge CN, Elliott AV, Plach JM, Ejim LJ, Wright GD, Droppo IG, Warren LA (2012). Diversity of integron- and culture-associated antibiotic resistance genes in freshwater floc. Appl Environ Microbiol 78(12):4367-4372.
- Du J, Xiao K, Li L, Ding X, Liu H, Lu Y, Zhou S (2013). Temporal and spatial diversity of bacterial communities in coastal waters of the South China sea. PLoS One 13;8(6):e66968. doi: 10.1371/journal.pone.0066968.
- Džidić S, Šušković J, Kos B (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. Food Technol Biotechnol 46(1): 11-21.
- Economou V, Gousia P (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. Infect Drug Resist 8:49-61.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (2009). Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 1.3 [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Rationale\\_documents/Ertapenem\\_EUCAST\\_Rationale\\_Document\\_1.3\\_090601.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Ertapenem_EUCAST_Rationale_Document_1.3_090601.pdf)
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (2013). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versión 1.0. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)

- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (2014). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 5.0. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- Evans J, Dyke KG (1988). Characterization of the conjugation system associated with the *Staphylococcus aureus* plasmid pJE1. J Gen Microbiol 134:1-8.
- Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmler B, Baquero F, Martínez JL (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. PLoS ONE 3(2):e1619, doi: 10.1371/journal.pone.0001619.
- Fernández L, Hancock RE (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. Clin Microbiol Rev 25(4):661-681.
- Fernández-Fuentes MA, Abriouel H, Ortega Morente E, Pérez Pulido R, Gálvez A (2014). Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. Int J Food Microbiol 172:49-56.
- Forsberg KJ, Patel S, Wencewicz TA, Dantas G (2015). The tetracycline destructases: a novel family of tetracycline-inactivating enzymes. Chem Biol 22(7):888-897.
- Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. Science 337:1107-1111.
- Fuchs PC, Barry AL, Brown SD (1999). In-vitro antimicrobial activity of a carbapenem, MK-0826 (L-749,345), and provisional interpretative criteria for disc tests. J Antimicrob Chemother 43:703-706.
- Furuhashi K, Kato Y, Goto K, Hara M, Yoshida S, Fukuyama M (2006). Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. Microbiol Immunol 50(1):11-7.

- Furuya EY, Lowy FD (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 4(1):36-45.
- Garcia-Migura L, Liebana E, Jensen LB (2007). Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. *J Antimicrob Chemother* 60(2):263-268.
- Gardan L, Bella P, Meyer JM, Christen R, Rott P, Achouak W, Samson R (2002). *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 6):2065-2074.
- Georgopapadakou NH (2004). Beta-lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets. *Expert Opin Investig Drugs* 13(10):1307-1318.
- Ginsburg I (2002). The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS* 110(11):753-770.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P (2012). Diversity of naturally occurring Ambler class B metallo- $\beta$ -lactamases in *Erythrobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 67:2661-2664.
- Gobernado M, Acuña C (2007). Ertapenem. *Rev Esp Quimioterap* 20(3):277-299.
- Gobernado M, Valdés L, Alós JI, García-Rey C, Dal-Ré R, García-de-Lomas J (2007a). Antimicrobial susceptibility of clinical *Escherichia coli* isolates from uncomplicated cystitis in women over a 1-year period in Spain. *Rev Esp Quimioterap* 20(1): 68-76.
- Gobernado M, Sanz-Rodríguez C, Villanueva R, Torroba L, Redondo E, González-Esteban J (2007b) Actividad in vitro de ertapenem frente a cepas bacterianas clínicas aisladas en 69 centros médicos españoles (Estudio E-test®) *Rev Esp Quimioter* 20(4):395-408.
- Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance

- of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Appl Environ Microbiol 66(1):125-132.
- Goto M (1983). *Pseudomonas ficuserectae* sp. nov., the causal agent of bacterial leaf spot of *Ficus erecta* Thunb. Int J Syst Bacteriol 33 (3):546-550.
  - Guardabassi L, Christensen H, Hasman H, Dalsgaard A (2004). Members of the genera *Paenibacillus* and *Rhodococcus* harbor genes homologous to enterococcal glycopeptide resistance genes *vanA* and *vanB*. Antimicrob. Agents Chemother 48:4915-4918.
  - Guenther S, Ewers C, Wieler LH (2011). Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? Front Microbiol 2:246, doi: 10.3389/fmicb.2011.00246.
  - Gupta PK, Appannanavar SB, Kaur H, Gupta V, Mohan B, Taneja N (2014). Hospital acquired urinary tract infection by multidrug-resistant *Brevundimonas vesicularis*. Indian J Pathol Microbiol 57(3):486-488.
  - Hage JE, Schoch PE, Cunha BA (2013). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* peritoneal dialysis-associated peritonitis. Perit Dial Int 33(2):223-224.
  - Hagiya H, Ogawa H, Takahashi Y, Yamamoto A, Otsuka F (2015). *Klebsiella oxytoca*-producing IMP-1 detected as the first strain of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in our hospital. Intern Med 54(22):2939-2941.
  - Hall AR, Iles JC, MacLean RC (2011). The fitness cost of rifampicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* depends on demand for RNA Polymerase. Genetics 187: 817-822.
  - Henriques IS, Araújo S, Azevedo JS, Alves MS, Chouchani C, Pereira A, Correia A (2012). Prevalence and diversity of carbapenem-resistant bacteria in untreated drinking water in Portugal. Microb Drug Resist 18(5):531-537. doi: 10.1089/mdr.2012.0029.

- Hernández-Allés S, Benedí VJ, Martínez-Martínez L, Pascual A, Aguilar A, Tomás JM, Albertí S (1999). Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother* 43:937-939.
- Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P, Mazel D, Miller SI (2012). Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog* 8(6). e1002778. doi: 10.1371/1002778.
- Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK (2001). Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2991-3000.
- Hooper DC, Jacoby GA (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann NY Acad Sci* 1354(1):12-31.
- Hopwood DA (2007). How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Mol Microbiol* 63(4):937-940.
- Hotchkiss R (2003). Selman Abraham Waksman. *Biographical Memoirs of the National Academy of Sciences* 83: 326; veasé la referencia original: Waksman S (1947). What is an antibiotic or antibiotic substance. *Mycologia* 39(5): 565-569.
- Huang Y, Zhang L, Tiu L, Wang HH (2015). Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front Microbiol* 6:914, doi: 10.3389/fmicb.2015.00914.
- Humeniuk C, Arlet, G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A (2002). Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata* probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3045-3049.
- Huovinen P (1987). Trimethoprim resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 31(10):1451-1456.

- Jamieson RE, Rogers AD, Billett DS, Smale DA, Pearce DA (2012). Patterns of marine bacterioplankton biodiversity in the surface waters of the Scotia Arc, Southern Ocean. *FEMS Microbiol Ecol* 80(2):452-468.
- Janda JM, Abbott SL (2010) .The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23(1):35-73.
- Jeon YL, Yang JJ, Kim MJ, Lim G, Cho SY, Park TS, Suh JT, Park YH, Lee MS, Kim SC, Lee HJ (2012). Combined *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* infection in a patient with oesophageal perforation. *J Med Microbiol* 61(Pt 12):1766-1769.
- Jiang X, Yu T, Liang Y, Ji S, Guo X, Ma J, Zhou L (2015). Efflux pump-mediated benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from retail food. *Int J Food Microbiol* 217:141-145.
- Kado CI (2009). Horizontal gene transfer: sustaining pathogenicity and optimizing host-pathogen interactions. *Mol Plant Pathol* 10(1):143-50.
- Kai AKL, Cheung YK, Yeung PKK, Wong JTY (2006). Development of single-cell PCR methods for the *Raphidophyceae*. *Harmful Algae* 6:649-657.
- Kamijo F, Uhara H, Kubo H, Nakanaga K, Hoshino Y, Ishii N, Okuyama R (2012). A case of mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a review of cutaneous infection. *Case Rep Dermatol* 4(1):76-79.
- Kim SE, Park SH, Park HB, Park KH, Kim SH, Jung SI, Shin JH, Jang HC, Kang SJ (2012). Nosocomial *Pseudomonas putida* bacteremia: high rates of carbapenem resistance and mortality. *Chonnam Med J* 48(2):91-95.
- Kovaleva J, Degener JE, van der Mei HC (2014). *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. *J Clin Microbiol* 52(5):1317-1321.



- Krulwich TA, Jin J, Guffanti AA, Bechhofer H (2001). Functions of tetracycline efflux proteins that do not involve tetracycline. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(2):237-246.
- Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily *Int J Bacteriol* 2013 pii 204141, doi: 10.1155/2013/204141.
- Kuzdan C, Soysal A, Özdemir H, Coskun S, Akman İ, Bilgen H, Özek E, Bakır M (2015). *Rahnella aquatilis* sepsis in a premature newborn. *Case Rep Pediatr* 2015:860671. doi: 10.1155/2015/860671.
- Lamoureaux TL, Vakulenko V, Toth M, Frase H, Vakulenko SB (2013). A novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, SGM-1, from an environmental isolate of *Sphingobium* sp. *Antimicrob Agents Chemother* 57(8):3783-3788.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackebrandt E y Goodfellow M, eds., pg. 115-175. John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido.
- Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 68(1):118-130.
- Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Pagès JM, Davin-Regli A (2013). An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 41(2):130-136.
- Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 19:141-160.

- Lee J, Yoon H, Lee S, Yoon Y (2012). Effect of NaCl on thermal resistance, antibiotic resistance, and human epithelial cell invasion of *Listeria monocytogenes*. Korean J Food Sci An 32(5):545-552.
- Li AD, Li LG, Zhang T (2015). Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. Front Microbiol 2015 6:1025, doi: 10.3389/fmicb.2015.01025.
- Li D, Yang M, Hu J, Zhang J, Liu R, Gu X, Zhang Y, Wang Z (2009). Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. Environ. Microbiol. 11(6):1506-1517.
- Li X-Z, Livermore DM, Nikaido H (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. Antimicrob Agents Chemother 38(8):1732-1741.
- Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev 28(2):337-418.
- Liu G, Tang CM, Exley RM (2015). Non-pathogenic *Neisseria*: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. Microbiology 161(7):1297-1312.
- Liu H, Yan J, Luo J, Yan R, Chen H, Cheng H, Liu D, He H (2014). Mycobacteriosis associated with *Mycobacterium peregrinum* infection in red-crowned cranes (*Grus japonensis*) in China. J Wildl Dis 50(3):703-706.
- Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW, Warner M (2001). Activity of ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with potent  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 45(10):2831-2837.
- Logan NA (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. J Appl Microbiol 112(3):417-429.

- López JR, Diéguez AL, Doce A, De la Roca E, De la Herran R, Navas JL, Toranzo AE, Romalde JL (2012). *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). Int J Syst Evol Microbiol 62(Pt 4):874-882.
- Lu B, Shi Y, Zhu F, Xu X (2013). Pleuritis due to *Brevundimonas diminuta* in a previously healthy man. J Med Microbiol 62(Pt 3):479-482.
- Lunau M, Lemke A, Walther K, Martens-Habbena W, M Simon (2005). An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. Environ Microbiol 7(7):961-968.
- Lupo A, Coyne S, Berendonk TU (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies. Front Microbiol 3:18, doi:10.3389/fmicb.2012.00018.
- Ma D, Hu Y, Wang J, Ye S, Li A (2006). Effects of antibacterials use in aquaculture on biogeochemical processes in marine sediment. Sci Total Environ 367(1):273-277.
- Magro-Checa C, Chaves-Chaparro L, Parra-Ruiz J, Peña-Monje A, Rosales-Alexander JL, Salvatierra J, Raya E (2011). Septic arthritis due to *Cellulosimicrobium cellulans*. J Clin Microbiol 49(12):4391-4393.
- Magurran AE (1988). Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Nueva Jersey.
- Majumdar R, Crum-Cianflone NF (2015). Necrotizing fasciitis due to *Serratia marcescens*: case report and review of the literature. Infection Oct 23. DOI 10.1007/s15010-015-0855-x.
- Marín I, Abad JP, Ureña D y Amils R (1995). High-ionic strength interference of ribosomal inhibition produced by aminoglycoside antibiotics. Biochemistry 34:16519-16523.

- Marín M, Gudiol F (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21(3):42-55.
- Marti E, Variatza E, Balcazar JL (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol* 22(1):36-41.
- Martínez JL (2009a). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc R Soc B* 276:2521-2530.
- Martínez JL (2009b). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157(11):2893-2902.
- Martínez JL (2012). Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2:265. doi:10.3389/fmicb.2011.00265.
- Martínez JL (2013). Bacterial pathogens: from natural ecosystems to human hosts. *Environ Microbiol* 15(2):325-333.
- Martínez JL, Baquero F, Andersson DI (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 5(12):958-965.
- Martínez JL, Baquero F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Ups J Med Sci* 119:68-77.
- Martínez JL, Coque TM, Baquero F (2015a). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol* 13(2):116-123.
- Martínez JL, Coque TM, Baquero F (2015b). Prioritizing risks of antibiotic resistance genes in all metagenomes. *Nat Rev Microbiol* 13(6):396. doi: 10.1038/nrmicro3399-c2.
- Martínez-Martínez L (2008). Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 26:481-484.
- Mary P, Defives C, Hornez JP (2000). Occurrence and multiple antibiotic resistance profiles of non-fermentative Gram-negative microflora in five brands of non-carbonated french bottled spring water. *Microb Ecol* 39(4):322-329.

- Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AK, Carroll J, Scheld WM, Hazen KC, Sifri CD (2011). Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals Intergenous KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. MBio 2(6):e00204-11, doi: 10.1128/mBio.00204-11.
- Matyar F (2012). Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. Bull Environ Contam Toxicol 89(3):551-556.
- McMahon MAS, Xu J, Moore JE, Blair IS, McDowell DA (2007). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. Appl Environ Microbiol 73(1):211-217.
- McManus MC (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Am J Health Syst Pharm 54:1420-1433.
- Medeiros AA, O'Brien TF, Wacker WEC, Yulung NF (1971). Effect of salt concentration on the apparent in vitro susceptibility of *Pseudomonas* and other Gram negative bacilli to gentamicin. J Infect Dis 124:S59-S64.
- Medeiros AA, O'Brien TF, Rosenberg EY, Nikaido H (1987). Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. J Infect Dis 156(5):751-757.
- MENSURA (2000). Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. Rev Esp Quimioter 13(1) [http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0100/consen2.html](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0100/consen2.html).
- Meziti A, Kormas KA, Moustaka-Gouni M, Karayanni H (2015). Spatially uniform but temporally variable bacterioplankton in a semi-enclosed coastal area. Syst Appl Microbiol 38(5):358-367.
- Mir SA, Abbas Z (2010). Chloramphenicol: A comeback. Jkscience 12(3): 153.

- Moore JE, Moore PJA, Millara BC, Goldsmitha CE, Loughreya A, Rooneya PJ et al. (2010). The presence of antibiotic resistant bacteria along the River Lagan. *Agricult Water Manag* 98:217-221.
- Moreno CE (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, Zaragoza.
- Moskot M, Kotlarska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Gabig-Cimińska M, Fari K, Wegrzyn G, Wróbel B (2012). Metal and antibiotic resistance of bacteria isolated from the Baltic Sea. *Int Microbiol* 15(3):131-139.
- Mudshingkar SS, Choure AC, Palewar MS, Dohe VB, Kagal AS (2013). *Ochrobactrum anthropi*: an unusual pathogen: are we missing them? *Indian J Med Microbiol* 31(3):306-308.
- Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, García-Valdés E (2009). An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol Cell Probes* 23:140-147.
- Muniesa M, Colomer-Lluch M, Jofre J (2013). Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations? *Mob Genet Elements* 3(4):e25847.
- Nanavaty J, Mortensen JE, Shryock TR (1998). The effects of environmental conditions on the in vitro activity of selected antimicrobial agents against *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 36(4):212-215.
- Narciso-da-Rocha C, Vaz-Moreira I, Manaia CM (2014). Genotypic diversity and antibiotic resistance in *Sphingomonadaceae* isolated from hospital tap water. *Sci Total Environ* 466-467:127-135.
- Nelson ML, Levy SB (2011). The history of the tetracyclines. *Ann NY Acad Sci* 1241:17-32.
- Nesme J, Cécillon S, Delmont TO, Monier J-M, Vogel TM, Simonet P (2014). Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol* 24(10):1096-1100.

- Nesme J, Simonet P (2015). The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol* 17(4):913-930.
- Nestorovich EM, Danelon C, Winterhalter M, Bezrukov SM (2002). Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9789-9794.
- Neyfakh AA (1992). The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob Agents Chemother* 36(2):484-485.
- Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB (1991). Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(11):4781-4785.
- Nieto JM, Sarmiento AM, Olías M, Canovas CR, Riba I, Kalman J, Delvalls TA (2007). Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. *Environ Int* 33(4):445-455.
- Nordmann P (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 44(2):51-56. doi: 10.1016/j.medmal.2013.11.007.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 17:1791-1798.
- Novák-Pékli M, el-Hadi Mesbah M, Pethó G (1996). Equilibrium studies on tetracycline-metal ion systems. *J Pharm Biomed Anal* 14(8-10):1025-1029.
- Nseir W, Taha H, Abid A, Khateeb J (2011). *Pseudomonas mendocina* sepsis in a healthy man. *Isr Med Assoc J* 13(6):375-376.
- Ochi F, Tauchi H, Moritani K, Miyamoto H, Ohkusu K, Ishii E (2015). *Tsukamurella inchoensis* infection in a child with Hodgkin's lymphoma. *Pediatr Int* 57(1):e7-10.

- Okada M, Inokuchi R, Shinohara K, Matsumoto A, Ono Y, Narita M, Ishida T, Kazuki C, Nakajima S, Yahagi N (2013). *Chromobacterium haemolyticum*-induced bacteremia in a healthy young man. BMC Infect 13:406, doi: 10.1186/1471-2334-13-406.
- Okoche D, Asiimwe BB, Katabazi FA, Kato L, Najjuka CF (2015) Prevalence and characterization of carbapenem-resistant **Enterobacteriaceae** isolated from Mulago National Referral Hospital, Uganda. PLoS ONE 10(8):e0135745. doi: 10.1371/ 0135745.
- Olías M, Cánovas CR, Nieto JM, Sarmiento AM (2006). Evaluation of the dissolved contaminant load transported by the Tinto and Odiel rivers (South West Spain). Appl Geochem 21:1733-1749.
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat 21-22:41-59.
- Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 38:71-78.
- Pagès JM, James CE, Winterhalter M (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol 6(12):893-903.
- Parachin NS, Mulder KC, Viana AA, Dias SC, Franco OL. (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. Peptides 38(2):446-456.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev 33:757-784.
- Patel R, Piper K, Cockerill III FR, Steckelberg JM, Yousten AA (2000). The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance



- gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob. Agents Chemother* 44:705-709.
- Paul S, Bezbaruah RL, Roy MK, Ghosh AC (1997). Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microb* 24:169-171.
  - Pednekar PB, Jain R, Thakur NL, Mahajan GB (2010). Isolation of multi-drug resistant *Paenibacillus* sp. from fertile soil: an imminent menace of spreading resistance. *J Life Sci* 1-10.
  - Pérez-López R, Nieto JM, López-Cascajosa MJ, Díaz-Blanco MJ, Sarmiento AM, Oliveira V, Sánchez-Rodas D (2011). Evaluation of heavy metals and arsenic speciation discharged by the industrial activity on the Tinto-Odiel estuary, SW Spain. *Mar Pollut Bull* 62(2):405-411.
  - Perry JA, Wright GD (2013). The antibiotic resistance "mobilome": searching for the link between environment and clinic. *Front Microbiol* 4:138, doi:10.3389/fmicb.2013.00138.
  - Perry JA, Wright GD (2014). Forces shaping the antibiotic resistome. *Bioessays* 36(12):1179-1184.
  - Petkar H, Li A, Bunce N, Duffy K, Malnick H, Shah JJ (2011). *Cellulosimicrobium funkei*: first report of infection in a nonimmunocompromised patient and useful phenotypic tests for differentiation from *Cellulosimicrobium cellulans* and *Cellulosimicrobium terreum*. *J Clin Microbiol* 49(3):1175-1178.
  - Philippe N, Maigre L, Santini S, Pinet E, Claverie JM, Davin-Régli AV, Pagès JM, Masi M (2015). *in vivo* evolution of bacterial resistance in two cases of *Enterobacter aerogenes* Infections during treatment with imipenem. *PLoS One* 10(9):e0138828, doi: 10.1371/journal.pone.0138828.
  - Piñeiro-Vidal M, Pazos F, Santos Y (2008). Fatty acid analysis as a chemotaxonomic tool for taxonomic and epidemiological

characterization of four fish pathogenic *Tenacibaculum* species. Lett Appl Microbiol 46(5):548-554.

- Pommier T, Canback B, Riemann L, Bostrom KH, Simu K, Lundberg P, Unlid A, Hagstrom A (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. Mol Ecol 16:867–880.
- Pontes DS, Pinheiro FA, Lima-Bittencourt CI, Guedes RLM, Cursino L, Barbosa F, Santos FR, Chartone-Souza E, Nascimento AMA (2009). Multiple antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. Microb Ecol 58(4):762-772.
- Poole K (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 56:20-51.
- Poole K (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the Max. Front Microbiol 2:65. doi: 10.3389/fmicb.2011.00065.
- Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. J Bacteriol 175(22):7363-7372.
- Ramón-García S, Martín C, Thompson CJ, Aínsa JA (2009). Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. Antimicrob Agents Chemother 53:3675-3682.
- Retsema J, Fu W (2001). Macrolides: structures and microbial targets. Int. J. Antimicrob. Agents 18(1):3-10.
- Riaz S, Bashir MF (2015). Phenotypic and molecular characterization of plasmid encoded extended spectrum beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp from Lahore, Pakistan. Trop J Pharm Res 14(9):1597-1604.
- Rice LB (2007). Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. Cleve Clin J Med 74, S12-S20.

- Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 6(9):981-989.
- Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA (2014). Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med* 370(16):1524-1531.
- Roszak DB, Colwell RR (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51:365-379.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Plasmid Vectors. En: Molecular cloning: a laboratory manual.* 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 1:42-43.
- Sánchez D, Matthijs S, Gomila M, Tricot C, Mulet M, García-Valdés E, Lalucat J (2014). *rpoD* Gene pyrosequencing for the assessment of *Pseudomonas* diversity in a water sample from the Woluwe river. *Appl Environ Microbiol* 80(15):4738-4744.
- Sanz JL, Marín I, Ureña D, Amils R (1993). Functional analysis of seven ribosomal systems from extremely halophilic archaea. *Can J Microbiol* 39:311-317.
- Sarmiento AM, Nieto JM, Casiot C, Elbaz-Poulichet F, Egal M (2009). Inorganic arsenic speciation at river basin scales: the Tinto and Odiel rivers in the Iberian Pyrite Belt, SW Spain. *Environ Pollut* 157(4):1202-1209.
- Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev* 27(4):927-948.
- Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater,

surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Ecol 43:325-335.

- Seiler C, Berendonk TU (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. Front Microbiol 3:399, doi: 10.3389/fmicb.2012.00399.
- Selje N, Brinkhoff T, Simon M (2005). Detection of abundant bacteria in the Weser estuary using culture-dependent and culture-independent approaches. Aquat Microb Ecol 39:17-34.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Front Microbiol 4(47):1-13.
- Shlaes DM (2006). An update on tetracyclines. Curr Opin Investig Drugs 7:167-171.
- Sjöstedt J, Martiny JBH, Munk P, Riemann L (2014). Abundance of broad bacterial taxa in the Sargasso Sea explained by environmental conditions but not water mass. Appl Environ Microbiol 80(9): 2786-2795.
- Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M (2008). Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 52(10):3648-3663.
- Soucy SM, Huang J, Gogarten JP (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. Nat Rev Genet 16(8):472-82.
- Soundarapandian, Reena Singh PS, Sowmiya S (2013). Recombination of plasmid-borne drug resistant *Paenibacillus* sp. isolated from Crab (*Portunus sanguinolentus*). Scientific reports 2:590. doi: 10.4172/scientificreports.590.
- Strano CP, Bella P, Licciardello G, Fiore A, Lo Piero AR, Fogliano V, Venturi V, Catara V (2015). *Pseudomonas corrugata* crpCDE is part of the cyclic lipopeptide corpeptin biosynthetic gene cluster and is

- involved in bacterial virulence in tomato and in hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. Mol Plant Pathol 16(5):495-506.
- Suárez C, Gudiol F (2009). Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 27(2):116-129.
  - Sumida K, Chong Y, Miyake N, Akahoshi T, Yasuda M, Shimono N, Shimoda S, Maehara Y, Akashi K (2015). Risk factors associated with *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia: a matched case-control study. PLoS One 10(7):e0133731, doi: 10.1371/journal.pone.0133731.
  - Szabó, D. Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, Bethel CR, Doi Y, Deeley K, Paterson DL (2006). Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 50:2833–2835.
  - Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann KH, Gützkow T, Eichler W, Pühler A, Schlüter A (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. Microbiology 155(Pt 7):2306-2319.
  - Tacão M, Correia A, Henriques IS (2015). Low prevalence of carbapenem-resistant bacteria in river water: resistance is mostly related to intrinsic mechanisms. Microb Drug Resist 21(5):497-506. doi: 10.1089/mdr.2015.0072.
  - Tahlan K, Ahn SK, Sing A, Bodnaruk TD, Willems AR, Davidson AR, Nodwell JR (2007). Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol 63(4):951-961.
  - Takenaka R, Nureki SI, Ueno T, Shigemitsu O, Miyazaki E, Kadota JI, Miki T, Okada N (2015). *Chromobacterium haemolyticum* pneumonia possibly due to the aspiration of runoff water. Jpn J Infect Dis 68 (6):526-529.

- Tängdén T, Adler M, Cars O, Sandegren L, Löwdin E (2013). Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem *in an in vitro* pharmacokinetic model. J Antimicrob Chemother 68(6):1319-1326.
- Tenover FC (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med (Suppl.) 119:3-10.
- Thaker MN, Waglechner N, Wright GD (2014). Antibiotic resistance-mediated isolation of scaffold-specific natural product producers. Nat Protoc 9(6):1469-1479.
- Thomas CM, Nielsen KM (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol 3(9):711-21.
- Threlfall EJ (2002). Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food-and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev 26:141-148.
- Tian GB, Wang HN, Zou LK, Tang JN, Zhao YW, Ye MY, Tang JY, Zhang Y, Zhang AY, Yang X, Xu CW, Fu YJ (2009). Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from pig farms in China. Foodborne Pathog Dis 6(3):297-304.
- Tichy EM, Luisi BF, Salmond GP (2014). Crystal structure of the carbapenem intrinsic resistance protein CarG. J Mol Biol 426(9):1958-1970.
- Torres C (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos. Siete décadas después de Fleming. Discurso de recepción Académica. Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza (Ed). Academia de Farmacia "Reino de Aragón". Zaragoza.
- Torres-Cortés G, Millán V, Ramírez-Saad HC, Nisa-Martínez R, Toro N, Martínez-Abarca F. (2011). Characterization of novel antibiotic

resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. *Environ Microbiol* 13(4):1101-1114.

- Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF (2003). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* 296:1064-1066.
- Tsui WH, Yim, G, Wang HH, McClure JE, Surette MG, Davies J (2004). Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome. *Chem Biol* 11:1307-1316.
- Turel O, Kavuncuoglu S, Hosaf E, Ozbek S, Aldemir E, Uygur T, Hatipoglu N, Siraneci R (2013). Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in neonates: clinical features and outcome. *Braz J Infect Dis* 17(4):450-454.
- Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM (2011). Diversity and antibiotic resistance patterns of *Sphingomonadaceae* isolates from drinking water. *Appl Environ Microbiol* 77(16):5697-5706.
- Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol Rev* 38(4):761-778.
- Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual Á, Rodríguez-Baño J (2015). Lessons from an outbreak of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* in an intensive care unit: the importance of time at risk and combination therapy. *J Hosp Infect* 89(2):123-131.
- Villain-Guillot P, Bastide L, Gualtieri M, Leonetti JP (2007). Progress in targeting bacterial transcription. *Drug Discov Today* 12:200-208.
- Voolaid V, Jõers A, Kisand V, Tenson T (2012). Co-occurrence of resistance to different antibiotics among aquatic bacteria. *BMC Microbiol* 12:225, doi: 10.1186/1471-2180-12-225.
- Waksman SA (1961). The role of antibiotics in nature. *Perspect Biol Med* 4:271-286.
- Walsh F, Duffy B (2013). The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PLoS ONE* 8(6): e65567.

- Walther-Rasmussen J, Høiby N, Class A (2007). Carbapenemases. J Antimicrob Chemother 60(3):470-82.
- Wenzler E, Kamboj K, Balada-Llasat JM (2015). Severe sepsis secondary to persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* bacteremia. Int J Infect Dis 35:93-95.
- Werner G, Freitas AR, Coque TM, Sollid JE, Lester C, Hammerum AM, Garcia-Migura L, Jensen LB, Francia MV, Witte W, Willems RJ, Sundsfjord A (2011). Host range of enterococcal vanA plasmids among Gram-positive intestinal bacteria. J Antimicrob Chemother 66(2):273-282.
- Wolska KI (2003). Horizontal DNA transfer between bacteria in the environment. Acta Microbiol Pol 52(3):233-43.
- Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD (2004). Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol Lett 236:137–143.
- Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? J Antimicrob Chemother 69(2):287-91.
- Wright GD (2010a). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? BMC Biol 8:123. doi: 10.1186/1741-7007-8-123.
- Wright GD (2010b). The antibiotic resistome. Expert Opin Drug Discov 5:779-788.
- Yang J, Wang C, Shu C, Liu L, Geng J, Hu S, Feng J (2013). Marine sediment bacteria harbor antibiotic resistance genes highly similar to those found in human pathogens. Microb Ecol 65:975-981.



- Yoon H, Park B-Y, Oh M-H, Choi K-H, Yoon Y (2013). Effect of NaCl on heat resistance, antibiotic susceptibility, and Caco-2 cell invasion of *Salmonella*. Biomed Res Int 274096:1-5.
- Zaballos M, López-López A, Ovreas L, Bartual SG, D'Auria G, Alba JC, Legault B, Pushker R, Daae FL, Rodríguez-Valera F (2006). Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea. FEMS Microbiol Ecol 56(3):389-405.
- Zamorano L, Miró E, Juan C, Gómez L, Bou G, González-López JJ, Martínez-Martínez L, Aracil B, Conejo MC, Oliver A, Navarro F (2015). Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases or carbapenemases from *Enterobacteriaceae*: findings from a multicenter study in Spain. Antimicrob Agents Chemother 59(9):5260-5266.
- Zhanel GG, Johanson C, Embil JM, Noreddin A, Gin A, Vercaigne L, Hoban DJ (2005). Ertapenem: review of a new carbapenem. Expert Rev Anti Infect Ther 3(1):23-39.
- Zhang T, Zhang XX, Ye L (2011) Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. PLoS ONE 6: e26041, doi: 10.1371/journal.pone.0026041.
- Zheng B, Tan S, Gao J, Han H, Liu J, Lu G, Liu D, Yi Y, Zhu B, Gao GF (2011). An unexpected similarity between antibiotic-resistant NDM-1 and beta-lactamase II from *Erythrobacter litoralis*. Protein Cell 2(3):250-258.
- Zhou LJ, Ying GG, Liu S, Zhao JL, Yang B, Chen ZF, Lai HJ (2013). Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China. Sci Total Environ. 452-453:365-376.
- Zhu W, Clark N, Patel JB (2013). pSK41-like plasmid is necessary for Inc18-like vanA plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to

## *Bibliografía*

*Staphylococcus aureus* in vitro. Antimicrob Agents Chemother  
57(1):212-219.

## **8. ANEXOS**



**Anexo 1.** Distribución de los perfiles de resistencia de los aislados procedentes de la ría de Huelva según su procedencia y medio de aislamiento.

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados							
		H1L-M	H1S-M	H2L-M	H2S-M	H1L-N	H1S-N	H2L-N	H2S-N
Ap	1,00	5	1	4	2	0	0	0	0
Ap, Vm	2,00	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Tm	2,01	0	0	0	0	0	0	1	0
Ap, Tc	2,02	2	0	0	1	0	0	0	0
Ap, Sm	2,03	0	0	2	0	0	0	1	0
Ap, Cc	2,04	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Tm, Vm	3,00	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Tc, Tm	3,01	1	1	0	0	0	0	0	0
Ap, Sm, Tc	3,02	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Nx, Tm	3,03	0	0	0	0	0	0	0	1
Ap, Nx, Sm	3,04	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Km, Sm	3,05	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Em, Sm	3,06	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cz, Tm	3,07	0	0	0	0	2	2	4	0
Ap, Cz, Tc	3,08	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Sm	3,09	0	0	0	0	0	0	1	0
Ap, Cz, Km	3,10	0	0	0	0	0	0	1	0
Ap, Cc, Em	3,11	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Nx, Tc, Tm	4,00	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Nx, Sm, Tm	4,01	1	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Nx, Sm, Tc	4,02	6	6	16	1	0	0	0	0
Ap, Km, Tc, Tm	4,03	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Km, Nx, Tc	4,04	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Em, Rp, Sm	4,05	0	0	0	0	0	0	1	0
Ap, Em, Nx, Sm	4,06	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Sm, Tm	4,07	0	0	0	0	1	0	1	1
Ap, Cz, Sm, Tc	4,08	0	0	2	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Nx, Tm	4,09	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cz, Nx, Sm	4,10	0	1	0	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Tc	4,11	0	1	0	0	0	0	0	0

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados							
		H1L-M	H1S-M	H2L-M	H2S-M	H1L-N	H1S-N	H2L-N	H2S-N
Ap, Cz, Km, Sm	4,12	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Em, Tm	4,13	0	0	0	0	0	0	1	0
Ap, Sm, Tc, Tm, Vm	5,00	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Nx, Tc, Tm, Vm	5,01	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Nx, Sm, Tm, Vm	5,02	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Nx, Sm, Tc, Tm	5,03	17	1	33	1	0	0	0	0
Ap, Nx, Rp, Sm, Tc	5,04	2	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Km, Nx, Tc, Tm	5,05	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Km, Nx, Sm, Tc	5,06	1	0	3	0	0	0	0	0
Ap, Em, Rp, Sm, Tm	5,07	0	0	0	0	1	0	0	1
Ap, Cz, Sm, Tm, Vm	5,08	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Sm, Tc, Tm	5,09	0	0	4	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Rp, Sm, Tm	5,10	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cz, Nx, Tc, Tm	5,11	3	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Nx, Sm, Tm	5,12	2	0	0	3	1	1	0	2
Ap, Cz, Nx, Sm, Tc	5,13	1	1	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Tc, Tm	5,14	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Sm, Tc	5,15	0	0	3	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Sm	5,16	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Nx, Sm	5,17	2	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	6,00	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	6,01	1	0	3	1	0	0	0	0
Ap, Km, Sm, Tc, Tm, Vm	6,02	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Km, Nx, Sm, Tc, Vm	6,03	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	6,04	5	0	6	0	0	0	0	0
Ap, Km, Nx, Rp, Sm, Tc	6,05	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Em, Rp, Sm, Tm, Vm	6,06	0	0	0	0	0	0	1	0
Ap, Em, Nx, Sm, Tm, Vm	6,07	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Em, Nx, Sm, Tc, Tm	6,08	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Em, Nx, Rp, Sm, Vm	6,09	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Sm, Tc, Tm, Vm	6,10	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Nx, Sm, Tm, Vm	6,11	0	0	0	0	2	2	0	0

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados							
		H1L-M	H1S-M	H2L-M	H2S-M	H1L-N	H1S-N	H2L-N	H2S-N
Ap, Cz, Nx, Sm, Tc, Tm	6,12	26	9	10	6	0	0	0	0
Ap, Cz, Nx, Rp, Sm, Tm	6,13	0	0	0	0	1	1	0	0
Ap, Cz, Nx, Rp, Sm, Tc	6,14	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Sm, Tm, Vm	6,15	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Sm, Tc, Tm	6,16	1	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Tc, Tm	6,17	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Sm, Tc	6,18	0	0	2	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Sm, Tc	6,19	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Sm, Tc, Tm	6,20	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Em, Rp, Sm, Tm	6,21	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cz, Em, Nx, Sm, Tm	6,22	0	0	0	0	3	0	0	1
Ap, Cz, Em, Km, Sm, Tm	6,23	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Sm	6,24	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cc, Sm, Tc, Tm, Vm	6,25	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	7,00	1	0	2	0	0	0	0	0
Ap, Em, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	7,01	1	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tm	7,02	0	0	0	0	1	0	1	0
Ap, Cz, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	7,03	1	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	7,04	0	0	0	0	0	0	0	1
Ap, Cz, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	7,05	6	4	2	3	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Sm, Tc, Tm, Vm	7,06	5	1	2	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Tc, Tm, Vm	7,07	0	0	3	1	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Sm, Tc, Vm	7,08	0	0	0	1	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	7,09	4	7	11	3	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tm	7,10	0	0	0	1	0	0	0	0
Ap, Cz, Em, Rp, Sm, Tm, Vm	7,11	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Nx, Sm, Tm, Vm	7,12	0	0	0	0	0	2	0	4
Ap, Cz, Em, Nx, Sm, Tc, Tm	7,13	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Em, Nx, Rp, Sm, Tm	7,14	0	0	0	0	1	1	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Tc, Tm, Vm	7,15	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Rp, Tm, Vm	7,16	0	0	0	0	0	2	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tm	7,17	0	0	0	1	0	1	0	0

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados							
		H1L-M	H1S-M	H2L-M	H2S-M	H1L-N	H1S-N	H2L-N	H2S-N
Ap, Cc, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	7,18	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cc, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	7,19	1	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Km, Nx, Tc, Tm, Vm	7,20	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	7,21	1	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Em, Nx, Sm, Tm, Vm	7,22	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cc, Cz, Nx, Sm, Tc, Tm	7,23	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Nx, Rp, Tc, Vm	7,24	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Sm, Tm	7,25	0	0	0	0	1	1	0	0
Ap, Cz, Em, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	8,00	0	0	0	0	0	0	0	1
Ap, Cz, Em, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	8,01	0	0	0	0	1	1	0	0
Ap, Cz, Em, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	8,02	0	1	1	0	0	0	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Rp, Sm, Tm, Vm	8,03	0	0	0	0	3	2	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tc, Vm	8,04	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	8,05	3	3	2	2	0	0	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tm	8,06	0	0	0	0	0	0	1	0
Ap, Cc, Km, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	8,07	0	0	3	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	8,08	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Em, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	8,09	0	0	0	1	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	8,10	1	0	0	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	8,11	1	0	0	0	0	0	0	1
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Tc, Tm, Vm	8,12	0	1	0	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	8,13	0	1	3	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Rp, Tc, Tm	8,14	0	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Sm, Tm, Vm	8,15	0	0	0	0	0	0	0	43
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Sm, Tm, Vm	8,16	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Sm, Tc, Vm	8,17	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Tm, Vm	8,18	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tm	8,19	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	8,20	11	3	4	1	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	8,21	4	2	10	10	0	0	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	9,00	5	1	2	2	0	0	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	9,01	0	0	0	0	1	6	0	0

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados							
		H1L-M	H1S-M	H2L-M	H2S-M	H1L-N	H1S-N	H2L-N	H2S-N
Ap, Cz, Em, Km, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	9,02	0	0	0	0	1	0	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	9,03	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	9,04	3	1	3	2	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	9,05	6	0	1	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	9,06	1	0	2	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	9,07	0	0	0	1	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	9,08	0	1	0	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tm, Vm	9,09	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	9,10	0	0	0	3	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tm	9,11	0	0	0	0	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	10,00	1	1	0	1	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	10,01	2	1	3	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	10,02	0	1	0	0	0	3	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	10,03	0	0	0	0	0	0	2	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	10,04	0	0	0	0	2	2	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm	10,05	0	1	1	0	0	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	11,00	2	3	1	1	1	3	2	2



**Anexo 2:** Distribución de los perfiles de resistencia de los aislados de la Chorrera de Despeñalagua.

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados			
		G1-M	G2-M	G1-N	G2-N
Ap	1,00	0	0	4	2
Ap, Vm	2,00	0	0	2	0
Ap, Rp, Vm	3,00	0	0	3	0
Ap, Em, Tm	3,01	0	0	0	1
Ap, Em, Vm	3,02	0	0	0	1
Ap, Cz, Tm	3,03	0	0	0	29
Ap, Cz, Rp	3,04	0	0	1	0
Ap, Tm, Vm	3,05	0	0	6	2
Ap, Nx, Vm	3,06	0	0	1	0
Ap, Em, Tm, Vm	4,00	0	0	3	0
Ap, Em, Rp, Vm	4,01	0	0	2	2
Ap, Rp, Tm, Vm	4,02	0	0	1	0
Ap, Cz, Nx, Tc	4,03	0	1	0	0
Ap, Cz, Nx, Tm	4,04	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Tc	5,00	1	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Nx, Tm	5,01	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Tm	5,02	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Sm, Tm	5,03	0	0	1	0
Ap, Cz, Nx, Tc, Tm	5,04	0	1	0	0
Ap, Km, Nx, Tc, Tm	5,05	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Rp, Vm	5,06	0	0	1	2
Ap, Cz, Km, Sm, Vm	5,07	0	0	1	0
Ap, Cc, Em, Tm, Vm	5,08	0	0	1	2
Ap, Cz, Km, Tm, Vm	5,09	0	0	1	0
Ap, Em, Km, Tm, Vm	5,10	0	0	1	0
Ap, Cc, Rp, Tm, Vm	5,11	0	0	1	0
Ap, Cz, Rp, Tm, Vm	5,12	0	0	0	1

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	G1-M			
		G1-M	G2-M	G1-N	G2-N
Ap, Em, Rp, Tm, Vm	5,13	0	0	2	5
Ap, Km, Rp, Tm, Vm	5,14	0	0	0	1
Ap, Nx, Tc, Tm, Vm	5,15	0	5	0	0
Ap, Rp, Tc, Tm, Vm	5,16	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Tc, Tm	6,00	1	25	0	0
Ap, Cz, Nx, Rp, Tc, Tm	6,01	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Rp, Tc, Tm	6,02	0	0	2	0
Ap, Cz, Em, Km, Tm, Vm	6,03	0	0	1	0
Ap, Cc, Cz, Rp, Tm, Vm	6,04	0	0	2	0
Ap, Cc, Em, Rp, Tm, Vm	6,05	0	0	20	52
Ap, Cz, Em, Rp, Tm, Vm	6,06	0	0	10	15
Ap, Cz, Km, Sm, Tm, Vm	6,07	0	0	1	0
Ap, Cc, Nx, Tc, Tm, Vm	6,08	0	1	0	0
Ap, Em, Nx, Tc, Tm, Vm	6,09	0	2	0	0
Ap, Km, Nx, Tc, Tm, Vm	6,10	4	1	0	0
Ap, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	6,11	0	4	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Tc, Tm	7,00	0	2	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Rp, Tc, Tm	7,01	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	7,02	0	4	0	1
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Sm, Vm	7,03	0	0	1	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Sm, Vm	7,04	0	0	2	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Tm, Vm	7,05	0	0	2	0
Ap, Cc, Cz, Em, Rp, Tm, Vm	7,06	0	0	28	12
Ap, Cc, Em, Nx, Rp, Tm, Vm	7,07	0	0	2	1
Ap, Cc, Cz, Km, Sm, Tm, Vm	7,08	0	0	2	0
Ap, Cc, Em, Rp, Sm, Tm, Vm	7,09	0	0	4	1
Ap, Cz, Em, Rp, Sm, Tm, Vm	7,10	0	0	2	0
Ap, Cc, Km, Nx, Tc, Tm, Vm	7,11	0	1	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Tc, Tm, Vm	7,12	0	1	0	0
Ap, Em, Km, Nx, Tc, Tm, Vm	7,13	2	0	0	0
Ap, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	7,14	4	4	0	0
Ap, Cc, Em, Rp, Tc, Tm, Vm	7,15	0	0	1	0

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados			
		G1-M	G2-M	G1-N	G2-N
Ap, Cc, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	7,16	0	3	0	0
Ap, Cz, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	7,17	0	1	0	0
Ap, Em, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	7,18	0	1	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Sm, Tc, Tm	8,00	1	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Sm, Tc, Vm	8,01	0	0	0	1
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Rp, Tm, Vm	8,02	0	0	0	1
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Rp, Tm, Vm	8,03	0	0	7	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Sm, Tm, Vm	8,04	0	0	3	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Sm, Tm, Vm	8,05	0	0	1	0
Ap, Cc, Cz, Em, Rp, Sm, Tm, Vm	8,06	0	0	6	6
Ap, Cc, Em, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	8,07	0	0	0	1
Ap, Cc, Cz, Em, Rp, Tc, Tm, Vm	8,08	0	0	0	1
Ap, Cc, Em, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	8,09	0	6	0	0
Ap, Cz, Em, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	8,10	0	1	0	0
Ap, Cc, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	8,11	3	9	0	0
Ap, Cz, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	8,12	0	5	0	0
Ap, Em, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	8,13	19	7	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Tm, Vm	9,00	0	0	1	1
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Rp, Sm, Tm, Vm	9,01	0	0	0	2
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Sm, Tc, Tm, Vm	9,02	0	0	1	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	9,03	0	0	5	1
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	9,04	0	0	1	0
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	9,05	0	3	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	9,06	1	4	0	0
Ap, Cc, Em, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	9,07	8	28	0	0
Ap, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	9,08	1	8	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tm, Vm	10,00	1	0	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Tc, Tm, Vm	10,01	0	22	0	0
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	10,02	0	0	0	1
Ap, Cc, Cz, Em, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	10,03	0	2	0	0
Ap, Cc, Cz, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	10,04	0	1	2	0
Ap, Cc, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	10,05	0	4	0	0

Perfil de Antibióticos	Nº Perfil	Número de aislados			
		G1-M	G2-M	G1-N	G2-N
Ap, Cc, Cz, Em, Km, Nx, Rp, Sm, Tc, Tm, Vm	11,00	1	8	2	0

Cont. 3.

